

Aus dem Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie (LIED)
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. R. Ludwig

**Die Wirkung von Fumarsäure, intravenösen
Immunglobulinen und dem HSP90-Inhibitor 17-DMAG
auf die Antikörper induzierte Leukozytenaktivierung im
Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von
Martin Hänsel
aus Rostock

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Hennig

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.05.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Überblick	7
1.2	Dermo-Epidermale Junktionszone	7
1.3	Bullöse Autoimmundermatosen	9
1.4	Das bullöse Pemphigoid	12
1.4.1	Epidemiologie.....	12
1.4.2	Pathophysiologie.....	12
1.5	Die Epidermolysis bullosa acquisita	20
1.5.1	Epidemiologie.....	20
1.5.2	Pathophysiologie.....	21
1.6	Diagnostik von BP und EBA.....	26
1.6.1	Klinische Manifestation.....	26
1.6.2	Histopathologische Untersuchung.....	28
1.6.3	Direkte Immunfluoreszenz (DIF)	28
1.6.4	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	29
1.6.5	ELISA und Westernblot	30
1.7	Therapie	30
1.7.1	Bullöses Pemphigoid	30
1.7.2	Epidermolysis Bullosa Acquisita.....	32
1.8	Verwendete immunmodulatorische Wirkstoffe.....	34
1.8.1	Intravenöse Immunglobuline (IVIG).....	34
1.8.2	Dimethylfumarat (DMF)	35
1.8.3	Heat Shock Protein 90-Inhibitor 17-DMAG	35
1.9	Ziel der Arbeit	37
2	MATERIAL UND METHODEN	38
2.1	Material.....	38
2.1.1	Verwendete Laborgeräte.....	38
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	39
2.1.3	Chemikalien und Farbstoffe	40
2.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	40
2.1.5	Verwendete Pharmaka, Antigene und Antikörper.....	41

2.2	ROS-Freisetzungs-Assay.....	45
2.2.1	Grundprinzip der ROS-Freisetzungs-Assays.....	45
2.2.2	Verwendete Autoantikörper.....	46
2.2.3	Coating der MicroWell-Platte und Bildung der Immunkomplexe	46
2.2.4	Aufreinigung von Neutrophilen Granulozyten mit Polymorphprep®.....	47
2.2.5	Herstellung der Pharmakonlösungen	48
2.2.6	Ansetzen von Luminol und FMLP	49
2.2.7	Starten der Reaktion und photometrische Messung	49
2.3	Gefrierschnitt-Assay.....	50
2.3.1	Grundprinzip des Gefrierschnitt-Assays.....	50
2.3.2	Verwendete Autoantikörper von Patienten.....	51
2.3.3	Herstellen von Gefrierschnitten humaner Haut	51
2.3.4	Inkubation der Cryoschnitte mit Autoantikörper-Serum.....	51
2.3.5	Isolation und Vitalitätsprüfung humaner Neutrophiler Granulozyten.....	52
2.3.6	Anfertigung der Pharmakonlösung mit humanen Neutrophilen Granulozyten.....	53
2.3.7	Inkubation der Gefrierschnitte mit den Zellsuspensionen und Medikamenten	54
2.3.8	Färben und mikroskopische Auswertung	54
2.4	Statistische Auswertung und grafische Darstellung	55
3	ERGEBNISSE.....	56
3.1	Intravenöse Immunglobuline reduzieren die Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies im ROS-Freisetzungs-Assay.....	56
3.2	Hemmung der dermo-epidermalen Spaltbildung durch Dimethylfumarat.....	59
3.3	HSP90-Inhibitor 17-DMAG verhindert vollständig die dermo- epidermale Spaltbildung und reduziert potent die ROS-Freisetzung	63
4	DISKUSSION.....	69
4.1	Intravenöse Immunglobuline und ihre Wirkung im in vitro ROS- Freisetzungs-Assay	69
4.2	Dimethylfumarat – antiinflammatorische Wirkung des lange bekannten Psoriasismedikament im Gefrierschnitt-Assay.....	74

4.3	Wirkung des HSP90-Inhibitor 17-DMAG im Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay mit Epidermolysis bullosa acquisita Autoantikörpern.....	79
4.4	Limitationen der verwendeten Assays.....	83
4.5	Ausblick.....	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATURVERZEICHNIS	88
7	ANHÄNGE	108
8	DANKSAGUNG	112
9	LEBENS LAUF.....	113

Abkürzungsverzeichnis

17-DMAG	<i>17-(Dimethylaminoethylamino) -17-demethoxygeldanamycin</i>
AK	Antikörper
AUC	<i>Area under the Curve</i>
BP	bullöses Pemphigoid
COL7	Kollagen 7/Typ-VII-Kollagen
CPS	<i>counts per second</i>
DEJ	dermo-epidermale Junctionszone
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DMF	Dimethylfumarat
EBA	Epidermolysis bullosa acquisita
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
EPO	Eosinophile Peroxidase
FMLP	<i>N-formyl-Met-Leu-Pro</i>
GA	Gefrierschnitt-Assay
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSP-90	<i>heat shock protein 90</i>
IgG	Immunglobulin G
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix-Metallo Proteinasen
MPO	Myeloperoxidase
NC1	Nicht kollagene Domäne 1 von COL7
NC16A	Nicht kollagene Domäne 16 A von BP-180
NE	Neutrophilen Elastase
NK	Negativkontrolle
NOX	NADPH-Oxidasen
PK	Positivkontrolle
PK-EtOH	Positivkontrolle Ethanol
ROS	<i>reactiv oxygen species</i>
RFA	ROS-Freisetzungs-Assay
SSST	<i>salt-split-skin</i> Technik
T _H	T-Helferzelle

1 Einleitung

1.1 Überblick

Diese experimentelle Arbeit gehört in den Bereich der Entzündungsforschung. Als Modellerkrankungen wurden die Gruppe der bullösen Autoimmundermatosen, mit dem bullösen Pemphigoid (BP) und der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), gewählt. Pathophysiologisch besteht jeweils eine Autoantikörper-induzierte Granulozytenaktivierung [229, 268]. Der Effekt von möglichen immunmodulatorischen Wirkstoffen, wie intravenösen Immunglobulinen (IVIg), dem HSP90-Inhibitor (*Heat shock protein 90 Inhibitor*) 17-DMAG und Dimethylfumarat (DMF) wurde in den *in vitro* Assays: ROS-Freisetzung-Assay (*Reactive Oxygen Species Release Assay/ RFA*) und Gefrierschnitt-Assay (*Cryosection Assay/ GA*) untersucht.

Als Zielsetzung galt es, Alternativen für die, durch den Einsatz von Glukokortikoiden nebenwirkungsreiche, immunsuppressive Therapie für BP und EBA-Patienten zu finden [134]. Gleichzeitig stellt diese Arbeit auch eine Hemmstudie von aktivierten Neutrophilen Granulozyten dar, mit übertragbaren Ergebnissen auf andere Autoimmunerkrankungen.

Maßgebliche Anteile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht [181, 252].

1.2 Dermo-Epidermale Junktionszone

Die Haut kann hinsichtlich der Morphologie in Epidermis, Dermis und Subkutis unterteilt werden. Die Basalmembran, auch dermo-epidermale Junktionszone (DEJ) genannt, markiert den Übergang von Epidermis und Dermis und lässt sich in drei Schichten unterteilen: Lamina lucida, Lamina densa und Sublamina densa. Sie wird von zahlreichen Verankerungskontaktstrukturen gebildet und durchzogen, welche den Zusammenhalt gewährleisten [37, 231] (Abbildung 1).

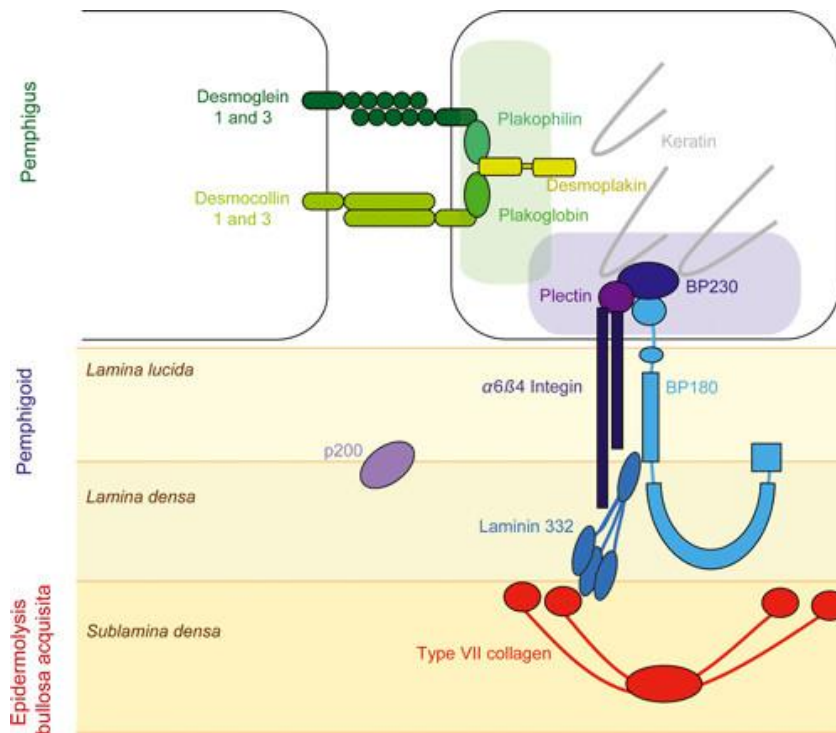


Abbildung 1: Aufbau der dermo-epidermalen Junktionszone aus Strukturproteinen (nach Bieber et al. 2010 [18]). Schematische Darstellung der Schichten der dermo-epidermalen Junktionszone (DEJ). Die Antigene für BP (BP-180, BP-230) und EBA (Typ-VII-Kollagen/COL7) sind als Bestandteile des Strukturverbandes dargestellt.

Dazu gehören Hemidesmosomen, welche als membranassoziierte, supramolekulare Komplexe das erste Element der Verbindung zwischen dem Zytoskelett der basalen Keratinozyten als Bestandteil der Epidermis und den Papillen der Dermis bilden. Die zentrale intrazelluläre Komponente des Hemidesmosom-Komplexes ist scheibenförmig und besteht aus den hemidesmosomalen Plaque-Proteinen BP-230 und Plectin. Daran binden Keratinfibrille, $\alpha 6 \beta 4$ Integrin und BP-180. Die extrazellulären Bestandteile von $\alpha 6 \beta 4$ Integrin und BP-180 reichen bis in die Lamina densa der Basalmembran, wo sie an Laminin 332 (ehemals Laminin 5) binden. Durch Laminin 332 wird eine Verbindung zu dem Anker-Plaques in der Sublamina densa, welcher hauptsächlich aus Typ-VII-Kollagen (COL7) besteht, geschaffen [14, 37, 42, 116, 163, 231] (Abbildung 1).

1.3 Bullöse Autoimmundermatosen

Der Überbegriff bullöse Autoimmundermatosen umfasst Autoimmunerkrankungen mit Autoantikörpern gegen Strukturproteine der Haut. Es wird ein initialer Toleranzverlust von T-Zellen gegenüber körpereigenen Strukturen angenommen, was in der Produktion von Autoantikörpern resultiert [7, 21, 116, 127, 145, 180]. Diese vermitteln direkt oder indirekt über Immunreaktionen eine lokale Gewebeerstörung und führen damit durch Lösung der Strukturverbände zur typischen Blasenbildung [231] (Abbildung 2).

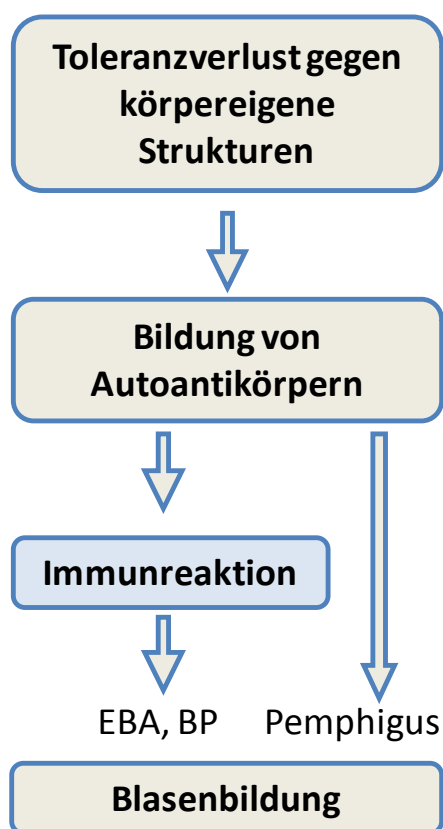


Abbildung 2: Orientierende Übersicht der Krankheitsentstehung bei bullösen Autoimmundermatosen. Eine indirekte Autoantikörper-Wirkung über eine Immunreaktion liegt bei BP und EBA vor. Bei Pemphigus vermitteln die Autoantikörper direkt die Gewebeerstörung. Im Fokus dieser Arbeit steht die durch Granulozyten vermittelte Immunreaktion bei BP und EBA.

Zu den bullösen Autoimmundermatosen gehören die Pemphigus Gruppe, die Pemphigoid Gruppe und weitere in beide Gruppe nicht einzuordnende bullöse Autoimmundermatosen.

Bei der Pemphigus Gruppe kommt es durch die Bildung von Autoantikörper gegen desmosomale Adhäsionsmoleküle (hauptsächlich Desmoglein 1 und 3) [159] zu einem intraepidermale Adhäsionsverlust mit Ausbildung einer intraepidermalen Blase im Bereich der Haut und Schleimhäute. Die häufigste Erkrankung dieser Gruppe stellt der Pemphigus vulgaris dar [91, 231]. In der Gruppe der Pemphigoide besteht eine subepidermale Blasen-

bildung. Je nach klinischem Phänotyp und Autoantigen-Profil werden verschiedene Varianten unterschieden. Neben dem bullösen Pemphigoid sind noch der Pemphigoid gestationis (Herpes gestationes), das vernarbende Schleimhautpemphigoid, die lineare IgA-Dermatose und der Lichen planus pemphigoides beschrieben. Die Epidermolysis bullosa acquisita wird ebenfalls der Pemphigoid Gruppe zugeordnet (Abbildung 3). Als ein neues Mitglied gilt das p200 Pemphigoid mit anti-Laminin $\gamma 1$ als Zielantigen [47, 76, 225]. Das bullöse Pemphigoid ist der häufigste Vertreter der bullösen Autoimmundermatosen. Eine Unterscheidung zur seltenen Pemphigus-Gruppe ist aufgrund einer bekannten erhöhten Mortalität in dieser Gruppe wichtig [139].

Weder in die Pemphigus, noch Pemphigoid-Gruppe einzuordnen ist die Dermatitis herpetiformis Duhring, welche die kutane Manifestation der Zöliakie darstellt. Im Folgenden ist tabellarisch das jeweilige Antigenmuster zur Autoimmundermatose zusammengefasst [121, 220] (Tabelle 1).

Tabelle 1: Bullöse Autoimmundermatosen und ihre Autoantigene (modifiziert nach Hertl et al. 2002 [91], Sitaru et al. 2004 [231] und Schmidt et al. 2011 [220]). Es werden drei Hauptgruppen unterschieden. Jeder Erkrankung kann ein charakteristisches Autoantigen-Profil zugeordnet werden. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen diese Antigene im ELISA und Westernblot beweist die jeweilige Autoimmundermatose.

Autoimmundermatose	Autoantigene
Pemphigus-Gruppe	
Pemphigus vulgaris	Desmoglein 1, Desmoglein 3
Pemphigus foliaceus	Desmoglein 1
Pemphigoid-Gruppe	
bullöses Pemphigoid	BP-180, BP-230
Pemphigoid gestationes	BP-180, BP-230
Vernarbendes Schleimhautpemphigoid	BP-180, $\alpha 6\beta 4$ Integrin, Laminin 332
Lineare IgA-Dermatose	lösliche Ektodomäne von BP180/LAD-1
p200 Pemphigoid	Laminin $\gamma 1$
Epidermolysis bullosa acquisita	Typ-VII-Kollagen (COL7)
Dermatitis herpetiformis Duhring	Transglutaminase

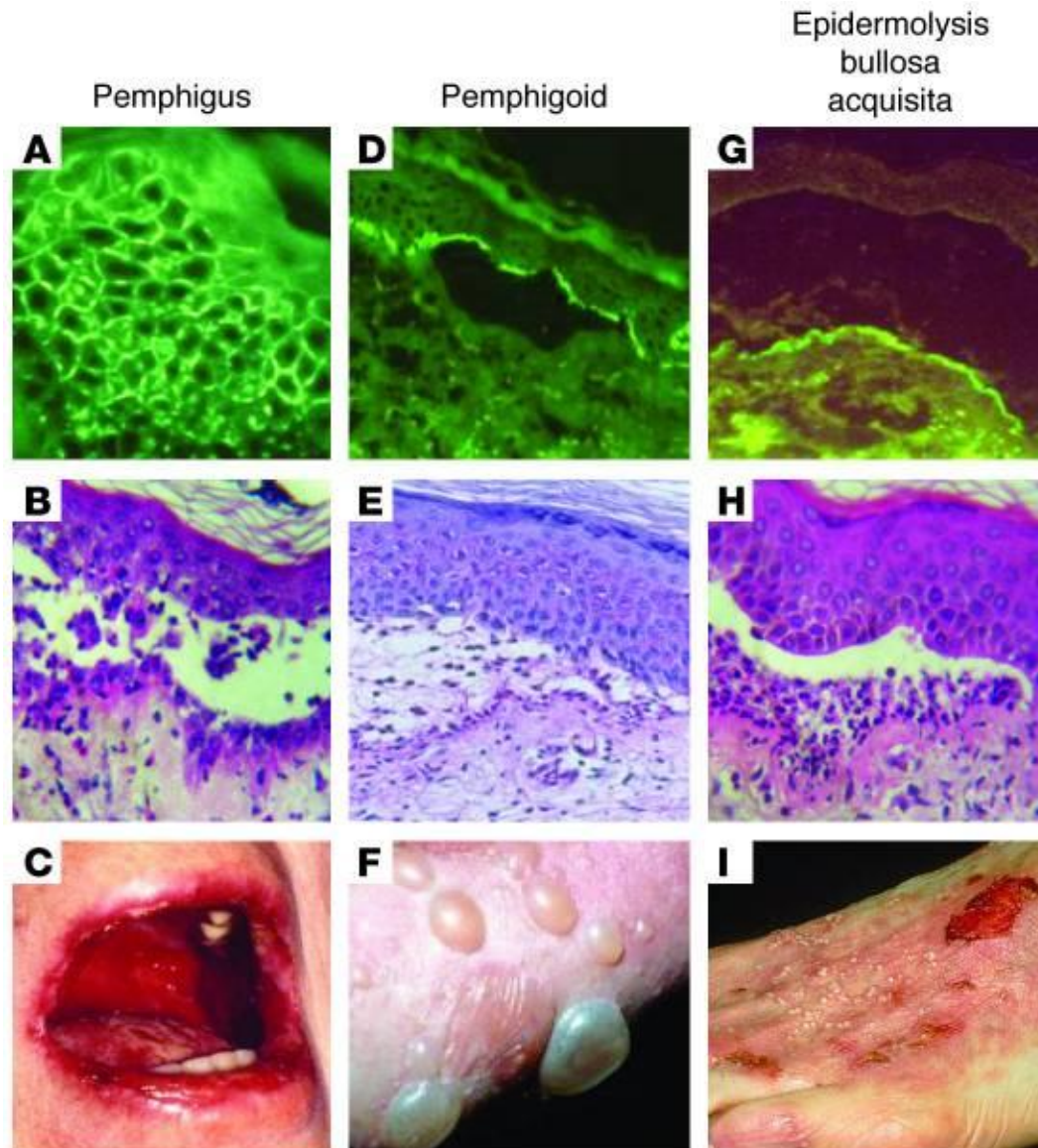


Abbildung 3: Diagnostische Unterschiede der verschiedenen Autoimmundermatosen (nach Hertl et al. 2006, [90]). Für jede Erkrankung ist das typische Muster der Immunfluoreszenz (direkten Immunfluoreszenz/DIF), die Histopathologie (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und der klinische Phänotyp dargestellt. Es zeigt sich in der DIF die disseminierte Anfarbung in der Epidermis bei Pemphigus, die lineare Ablagerung am Dach der dermo-epidermalen Blase bei BP und am Boden der Blase bei EBA. Histologisch ist zwischen der intraepidermalen Spaltbildung bei Pemphigus und der subepidermalen Spaltbildung mit Entzündungsinfiltraten bei BP und EBA zu unterscheiden. Klinisch wird bei Pemphigus die Schleimhautbeteiligung angedeutet. Bei BP zeigen sich die pathognomonischen prallelastischen Blasen. Bei EBA liegen hier straffe Blasen mit Tendenz zur Narben- und Milienbildung vor.

1.4 Das bullöse Pemphigoid

1.4.1 Epidemiologie

1953 wurde das bullöse Pemphigoid erstmals nach klinischen und histologischen Kriterien definiert. Durch histologische Unterschiede, wie fehlender Akantholyse, einer selteneren oralen Beteiligung und der Anwesenheit von prallelastischen, mechanisch stabileren Blasen konnte nun BP vom Pemphigus vulgaris, welcher mit einer hohen Mortalität einhergeht, abgegrenzt werden [139].

BP ist in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika der häufigste Vertreter der bullösen Autoimmundermatosen mit einer Inzidenz von 13-43/1Mio Fälle pro Jahr [126, 134, 220]. Die Prävalenz von BP wird in Deutschland aktuell mit 259,3 BP-Patienten pro 1 Millionen Bürger angegeben [97].

Es sind vorwiegend ältere Patienten betroffen (Mittleres Erkrankungsalter 70-80 Jahre). Klinisch imponieren prall elastisch gefüllte Blasen auf normaler oder geröteter Haut, die mit Juckreiz (Pruritus) einhergehen [121, 134, 158].

1.4.2 Pathophysiologie

Bei BP kommt es nach dem Verlust der peripheren Toleranz mit Ausbildung von autoreaktiven T_H-Zellen gegen die BP-180 und BP-230 Antigene [116, 145, 148, 248] zur Produktion von Auto-Antikörpern, die in der DEJ mit ihrem Zielantigen Immunkomplexe bilden [70, 111]. An die IgG-Immunkomplexe binden Komplementfaktoren und aktivieren das Komplementsystem [116, 121]. Die Rekrutierung von Granulozyten in die DEJ wird danach hauptsächlich über Komplement und IgE-aktivierte Mastzellen vermittelt [39, 55, 77, 116, 143, 148, 168, 281]. Auch eine Chemotaxis von Granulozyten durch Komponenten des Komplementsystem [39], durch BP-180 Bruchstücke [144] oder durch Zytokine von Keratinozyten [169, 219] und Mastzell-aktivierten Makrophagen wurde beschrieben [38, 173].

Antikörper aktivierte Granulozyten sind für die Freisetzung von Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS/*reactive oxygen species*) zuständig, welche die Haltestrukturen der DEJ zerstören, sodass eine subepidermale Spaltbildung resultiert [116, 148, 255].

Neben dieser Effektorzell-bedingten Gewebeerstörung wird auch von einer direkten Autoantikörper-vermittelten Strukturproteinveränderung berichtet [104, 169, 186, 191, 202, 235, 248].

1.4.2.1 Toleranzverlust

BP resultiert aus dem Verlust der peripheren Toleranz gegen BP-180 und BP-230 durch autoreaktive T-Helferzellen (T_H-Zellen) [116, 145, 148, 248]. Im experimentellen BP-Mausmodell benötigten naive B-Zellen zur Produktion von Autoantigenen T_H-Zellen [256]. T_H1-Zellen unterstützen vorwiegend die zelluläre Immunantwort und beeinflussen die Produktion von IgG1- und IgG2-Antikörper-Subklassen, wobei T_H2-Zellen entscheidend bei der humoralen Immunantwort beteiligt sind und zur Produktion von IgG4 und IgE führen [116]. Anhand des Zytokinprofils und der vorhandenen Autoantikörper-Subklassen bei BP-Patienten wird von einer gleichzeitigen Anwesenheit von T_H1- und T_H2-Zellen ausgegangen [116, 133, 145, 215-217]. *In vitro* differenzierten sich ebenfalls T-Zellen von BP-Patienten in beide T_H-Zell-Linien [145, 148]. Anhand der *in vitro* Ergebnisse wurde von einer Dominanz der T_H2-Antwort bei der Entstehung von BP ausgegangen [23, 116]. Auch eine vom zeitlichen Krankheitsverlauf abhängige T_H-Zell-Linien Dominanz mit einer T_H2- Zellen vermittelten initialen, akuten Phase und einer chronischen T_H1-Zellen-Phase wurde bei BP diskutiert [89].

Die genetische Ausstattung und Umwelteinflüsse sollen bei dem Toleranzverlust eine Rolle spielen. So sind folgende MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Klasse-II-Allele mit einem gehäuften Auftreten des bullösen Pemphigoids assoziiert: HLA-Typ (*Human Leukocyte Antigen*) DQB1*0301, -*0305, -*0602 und -*0603 [248, 275]. T-Zellen von gesunden Probanden mit dem HLA-Typ DQB1*0301 zeigten bei *in vitro* Inkubation mit dem BP-180 Antigen eine Autoimmun-Neigung durch Differenzierung zu autoreaktiven T_H1-Zellen [23]. In verschiedenen ethnischen Gruppen sind wiederum andere HLA-Typen mit dem bullösen Pemphigoid assoziiert [195]. Auch ein Polymorphismus der FcγIIIa-Rezeptor-Allele (FcγRIIIa/CD₁₆) hat Einfluss auf die Entwicklung von BP [265].

Als wichtiger Umwelteinfluss bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen gelten Infektionen mit Viren, z. B. mit dem EBV-Virus (*Ebstein-Barr Virus*). Eine Korrelationen einer EBV-Infektion mit dem Auftreten von BP ist nicht bestätigt [200]. Andere Viren, wie das Torque-Teno Virus (*Transfusion Transmitted Virus*), können möglicherweise mit BP assoziiert sein [19].

1.4.2.2 Zielantigene

Die Autoantikörper bei BP sind gegen das 230 kD schwere intrazellulär gelegene Strukturprotein BP-230 (*bullöse Pemphigoid Antigen 1*) und das 180 kD schwere intra- und extrazellulär gelegene Transmembranprotein BP-180 (*bullöse Pemphigoid Antigen 2, Typ XVII Kollagen*) gerichtet [54, 132, 179, 239-240]. Beide BP-Antigene sind Bestandteile der Hemidesmosomen der basalen Keratinozyten [248].

Der C-terminale, extrazelluläre Teil von BP-180 besteht aus 15 kollagenen Bereichen variabler Länge, die von 16 nicht-kollagenen Bereichen separiert werden. NC16A ist der erste nicht-kollagene Bereich, der sich an den transmembranösen Teil des Proteins anschließt [73, 140] (Abbildung 4).

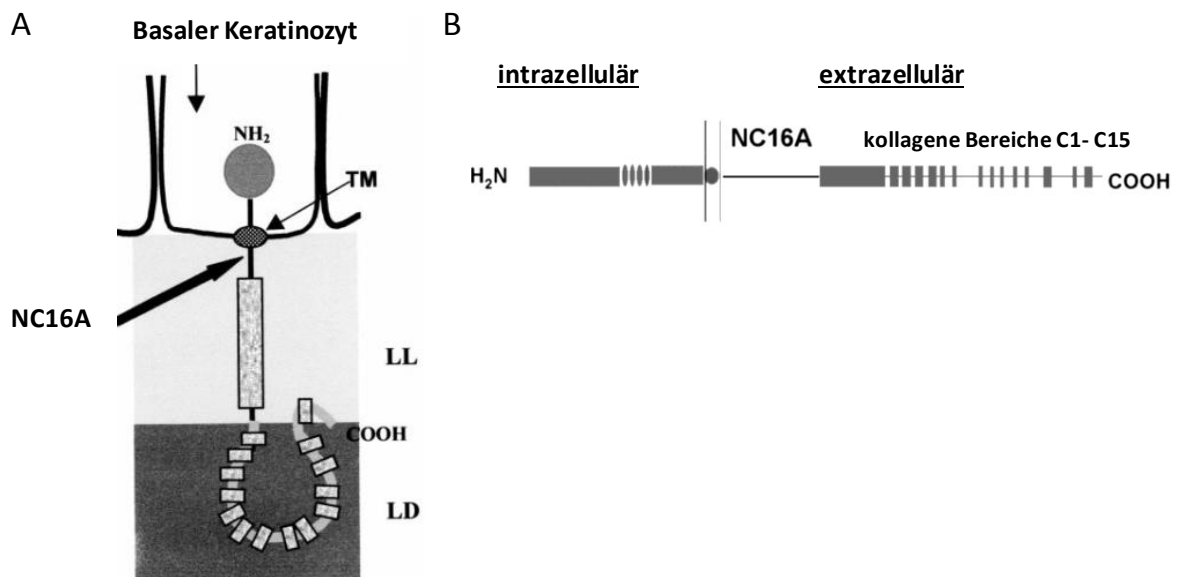


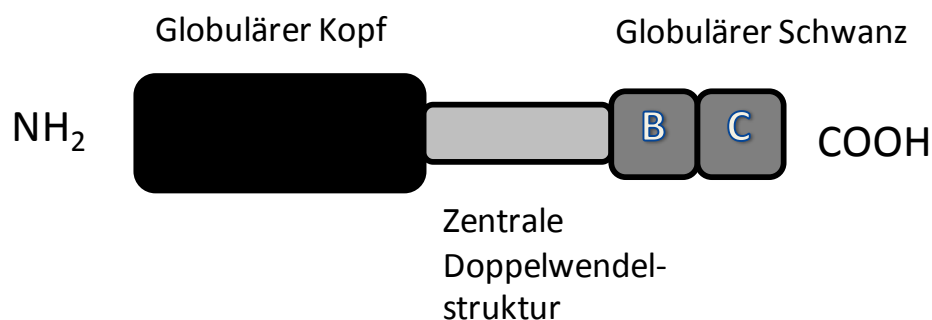
Abbildung 4: Lokalisation, Struktur und Hauptepitop von BP-180 (modifiziert nach Sitaru et. al 2002 und Thoma-Uszynski et al. 2004 [234, 247]): A: Dargestellt ist die Orientierung von BP-180 in der dermo-epidermalen Junctionszone ausgehend vom Basalen Keratinozyten und über die Lamina lucida (LL) in die Lamina Densa (LD) reichend. B: Auf dem extrazellulären C-terminalen Strang sind 16 nicht-kollagene Bereiche (graue Linie) getrennt von 15 kollagenen Bereichen (graue Kästchen) zu unterscheiden. Die immundominante NC16A-Domäne ist der letzte nicht-kollagene Bereich vor der Zellmembran.

Die meisten Autoantikörper (85-90 %) im Serum von BP-Patienten binden an die NC16A-Domäne des BP-180 [164, 184, 220]. Im 45 Aminosäuren langen N-terminalen Abschnitt von NC16A befinden sich 4 Epitope: MCW-0, MCW-1, MCW-2, MCW-3. Als Proteinfragmente isoliert reagieren diese Hauptepitope fast immer positiv mit BP-Antikörpern im

Westernblot [279-280]. Eine Häufung der Hauptepitope in der NC16A-Region wird unter anderem auf das physiologische „*Ectodomain shedding*“ zurückgeführt, da hier BP180 enzymatisch gespalten wird [192].

Autoantikörper gegen BP-230 werden bei bis zu 60-77 % der BP-Patienten gefunden [121, 220]. BP-230 ist ein intrazellulärer Bestandteil des Hemidesmosoms und weist eine Homologie zu Plektin und Desmoplakin I und II auf [164, 244]. Es besitzt eine zentrale Doppelwendelstruktur (*coil-coiled*), die von zwei globulären Enddomänen, einem N-terminalen globulären Kopf und einem C-terminalen globulären Schwanz umschlossen wird [213]. Das Hauptepitop von BP-230 liegt im Bereich der B und C Subdomäne des C-terminalen globulären Schwanzes [235] (Abbildung 5).

Abbildung 5:



Struktur und Epitope von BP-230 (modifiziert nach Di Zenzo et al. 2011 [53]): Schematischer Aufbau des intrazellulären BP-230 Antigens. Ein N- und C-terminales globuläres Ende flankiert die zentrale Doppelwendelstruktur. Das Hauptepitop von BP-230 ist in der B- und C-Subdomäne lokalisiert.

Neben den beschriebenen Hauptepitopen wurden bei BP-180 und BP-230 zusätzliche Epitope gefunden. Bei BP-180 wurden weitere extrazelluläre, aber auch intrazelluläre Epitope nachgewiesen [202, 248]. Eine mögliche Erklärung für die Existenz mehrerer Epitope auf einem Antigen wird in dem „*epitop spreading*“ Phänomen vermutet [257]. Die Ursache wird in einer Erreichbarkeit, der durch initiale Gewebeerstörung freigesetzten und enzymatisch zerkleinerten, intrazellulären Antigenen für autoreaktive Lymphozyten gesehen [29, 52, 91, 202]. Di Zenzo et al. konnten das „*epitop spreading*“ Phänomen bei 49 % ihrer BP-Patienten nachweisen [53, 86]. Es soll in einer frühen Phase der Erkrankung auftreten und korreliert dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung bei Diagnose [52-53].

Damit sich das bullöse Pemphigoid mit seinen typischen Erkrankungsmerkmalen manifestiert, müssen Autoantikörper gegen immundominante Epitope vorliegen. Der NC16A-

Region auf BP-180 werden diese Eigenschaften zugesprochen [228, 248]. Über Immunadsorption aufgereinigtes BP-180 IgG mit Reaktivität gegen NC16A führt im Vergleich zu Serum ohne NC16A-Reaktivität im Gefrierschnitt-Assay (GA) zu BP-Merkmalen [234]. Der Gefrierschnitt-Assay ist einer von zwei *in vitro* Tests dieser Arbeit. Bei dem Assay kommt es nach Ausbildung von BP-Immunkomplexen in der DEJ von kältefixierter (kryofixierter) Haut zur Aktivierung von Neutrophile Granulozyten, was in einer Gewebeerstörung mit BP-typischer Spaltbildung resultiert. Durch den Transfer von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen murines BP-180 in neonatalen Balb/c-Mäusen [149] und durch Injektion von humanen monoklonalen IgG1 Antikörpern gegen die humane BP-180 NC16A-Region in Typ-XVII-Kollagen-humanisierten Mäusen konnte eine BP-ähnliche Blasenbildung ausgelöst werden (passives Tiermodell) [142, 193]. Auch eine Immunisierung mit Induktion von Autoantikörpern durch Injektion des zum humanen NC16A homologen murinen Antigens resultiert im Mausmodell (aktives Tiermodell) zur klinischen BP-Manifestation und beweist die Rolle dieses imundominanten Epitops bei der Entstehung von BP [92].

Hinsichtlich der Pathogenität der BP-230 Autoantikörper bestand Unklarheit, da sie zunächst nur als Ereignisse im Rahmen des „*epitop spreading*“ Phänomen angesehen wurden [29]. In der Klinik sind aber Patienten mit milder BP-Manifestation und serologischem BP-230 ohne BP-180 Autoantikörper Nachweis bekannt [87]. Im aktiven Tiermodell entwickelten mit rekombinanten humanen BP-230 Antigenen immunisierte Kaninchen unter UV- B-Bestrahlung BP-typische Läsionen aus [82]. Zusätzlich konnten Anti-humane BP-230-Kaninchen-AK eine BP ähnliche Symptomatik bei subkutaner Injektion in neonatalen Mäusen im passiven Tiermodell provozieren [122]. Daher könnten auch BP-230 Antikörper eine wichtige Rolle in der BP-Pathogenese spielen; letztendlich ist deren pathogenetische Bedeutung jedoch weiterhin nicht sicher belegt.

1.4.2.3 Autoantikörper

Beim bullösen Pemphigoid liegen hauptsächlich IgG- und IgE-Autoantikörper vor. Bei einigen Patienten werden zusätzlich IgA-Autoantikörper gefunden, welche aber nach jetzigem Stand eine eher untergeordnete Rolle spielen [53, 220]. IgG gegen BP-180 wurde zu 85-94 % und IgG gegen BP-230 zu 60-82 % im Serum von BP-Patienten detektiert [220, 247, 279]. Bei der IgG Subklassen Differenzierung existieren in der Literatur unterschied-

liche Angaben, was mit dem zeitlichen Verlauf der Erkrankung mit unterschiedlicher T_H-Zell-Dominanz zu erklären ist [89]. Autoantikörper gegen BP-180 und BP-230 liegen in der Regel als IgG1- und IgG4-Subklasse vor [56, 105, 133, 142]. Das Gesamt-IgE ist in 85-88 % der Fälle im Serum erhöht [57, 121]. IgE gegen BP-180 war zu 22-34 % und gegen BP-230 zu 22-67 % im ELISA positiv [65, 102, 105].

Der Schweregrad der Manifestation und die Aktivität der Erkrankung wird durch den Serumtiter der Antikörper gegen NC16A-BP-180 widerspiegelt [56, 217].

1.4.2.4 Gewebeerstörung

An die Immunkomplexe in der DEJ binden Komplementfaktoren. In 94 % der Fälle wird der Komplementfaktor C3 in der Haut von BP-Patienten nachgewiesen [121]. Die Antikörper-vermittelte Aktivierung des klassischen Pfads des Komplementsystems soll bei BP vorliegen [116, 129, 138]. Besonders IgG1 ist zur Aktivierung der Komplement-Kaskade fähig, wohingegen IgG4 bei der Komplementaktivierung eher eine untergeordnete Rolle spielt [148]. IgE kann kein Komplement aktivieren [64]. Die Bindungsstelle für den ersten Faktor (C1q) in der Kaskade des klassischen Komplementpfades liegt auf dem Fc-Teil des Antikörpers. Rekombinantes anti-NC16A IgG, mit einer Mutation der C1q-Bindungsstelle, konnte in BP180-humanisierten Mäusen keine BP-Manifestation auslösen [142]. C4- und C5-Komplementfaktor-defiziente Mäuse waren ebenfalls gegen die Induktion einer experimentellen-BP resistent [148, 188]. Entscheidend ist schlussendlich die Produktion des Anaphylotoxins C5a, welches Mastzellen über den C5a-Komplementrezeptor (C5a-R) zur Degranulation bringt und die Migration von Neutrophilen Granulozyten in die Haut fördert [39, 88, 113, 116, 148].

Im inflammatorischen Infiltrat von BP Läsionen befinden sich Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten und Eosinophile Granulozyten. B-Lymphozyten sind in BP Läsionen kaum vorhanden [6]. Zu Beginn der Erkrankung sind vorwiegend mononukleäre Zellen im Gewebe anzutreffen. Später wandern Eosinophile und Neutrophile Granulozyten ein [215, 217]. Mastzellen sind schon von vornherein ubiquitär in der Haut vorhanden [16].

Im Gegensatz zu BP-Patienten mit Eosinophilen Granulozyten als dominante Zellform in BP-Läsionen [148] sind bei den passiven murinen Tiermodellen Neutrophile Granulozyten vorherrschend [121, 150]. In dem passiven Tiermodell entwickelt sich bei jeweiliger

Blockierung oder Entfernung von Mastzellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten keine BP aus [38-39, 150].

Durch ihre Produktion von IL-8 (*neutrophil chemotactic factor*) [143], Eotaxin 1 (CCL11) und Eotaxin 3 (CCL26) [77, 116] sind Mastzellen entscheidend bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten in die DEJ beteiligt [39, 55, 77, 116, 148, 168, 281]. Im passiven Transfermodell sollen Mastzellen für die initiale Rekrutierungsphase zuständig sein und insgesamt 2/3 aller Neutrophilen Granulozyten anlocken [39, 144]. Ihre Aktivierung wird hauptsächlich durch das Komplementsystem ausgelöst [39]. Des Weiteren werden sie durch autoreaktive IgE-Antikörper zur Degranulation gebracht [168, 281]. Zusätzlich können Mastzellen Makrophagen aktivieren, die chemotaktisch Granulozyten anlocken [38, 173].

Neben der Mastzellen- abhängigen Granulozyten Rekrutierung in die DEJ werden in der Literatur alternative Rekrutierungswege berichtet. So führen C5a und C3a als Elemente des Komplementsystems [39, 88, 116, 148] und BP-180 Bruchstücke selbst auch zur Chemotaxis von Granulozyten [144]. Ein Augenmerk liegt auch auf der Mastzell-unabhängigen Produktion von Zytokinen. Es wird unter anderem von einer Eotaxine-Produktion durch Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten in BP Läsionen berichtet [77, 116]. Des Weiteren konnte bei *in vitro* Inkubation von Keratinozyten mit BP-Patientenserum eine Produktion von IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden [169, 219]. Als mögliche Ursache gilt eine intrazelluläre Erhöhung des *Heat Shock Protein* 90 (HSP90) in Keratinozyten [251]. Besonders bei BP-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen eine Erhöhung von HSP90 in den Hautläsionen nachgewiesen werden [253].

Schlussendlich kommt es zu einem dermalen leukozytären Infiltrat, das mit den Immunkomplexen interagiert [273]. Eosinophile Granulozyten werden durch IgE-Autoantikörper über ihren FcεI-Rezeptor (FcεRI) aktiviert [168]. Sie besitzen ebenfalls FcγIIa-Rezeptoren (CD_{16a}) und konnten *in vitro* auch durch IgG-Autoantikörper zur ROS-Freisetzung angeregt werden [273]. Besonders FcγIIa- (CD_{32a}) und FcγIIIb- (CD_{16b}) Rezeptoren sind an der Aktivierung der humanen Neutrophilen Granulozyten bei BP beteiligt [273]. Bei humanen Neutrophilen Granulozyten wurde *in vitro* durch selektive Blockierung von Fcγ-Rezeptoren durch Anti-FcγR-Antikörper die dermo-epidermale Spaltbildung und die ROS-Freisetzung verhindert. Bei FcγIII-Rezeptor (FcγRIII, CD₁₆)-defizienten Mäusen konnten

im passiven Transfermodell keine Neutrophilen Granulozyten aktiviert werden und die Spaltbildung blieb aus [276].

Die aktivierten Granulozyten sind für die Freisetzung der meisten Enzyme und von ROS verantwortlich [276]. Zu den wichtigsten Enzymen zählen die Neutrophile Elastase (NE) und die Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Die Neutrophilen Elastase wird vor allem in Neutrophilen Granulozyten produziert [144]. Im Gefrierschnitt-Assay mit NE-Inhibitoren und im passiven Transfermodell mit NE-defiziente Mäusen bildete sich *in vitro* und *in vivo* keine Merkmale von BP aus, obwohl Neutrophile Granulozyten vorhanden waren [152, 225]. Von den MMPs sind vorwiegend MMP-2, MMP-9 und MMP-13 in BP-Läsionen erhöht. Als dominante Zellform in humanen BP-Läsionen sezernieren Eosinophile Granulozyten den größten Teil an MMP-9 (92-kD Gelatinase, Gelatinase B), gefolgt von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Selektive Inhibition von MMP-9 führten im Gefrierschnitt-Assay zu keiner Spaltbildung [225]. Im passiven Transfermodell sind besonders Neutrophile Granulozyten für die Produktion von MMP-9 zuständig [116, 153, 238]. MMP-9 defiziente Mäuse sind im passiven Transfermodell gegen BP-Antikörper resistent [153]. MMP-9 führt hauptsächlich zur Inaktivierung des α 1-Proteinase Inhibitors. Dadurch wird die Verfügbarkeit der Neutrophilen Elastase erhöht [144, 271]. Daneben ist MMP-9 auch zur Spaltung der extrazellulären Domäne von BP-180 fähig [238]. Das zunächst in seiner Pro-Form vorliegende proMMP-9 wird größtenteils durch das Plasminogen-/ Plasmin-System, aber auch durch Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA), andere MMPs, NE, Kallikrein, Chymase und ROS aktiviert [49, 151].

Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten und Makrophagen können nach Aktivierung im „*respiratory burst*“ große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) freisetzen [183, 204]. ROS sind Superoxide (Hyperoxide) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Sie werden hauptsächlich von den NADPH-Oxidasen (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase/ NOX*) produziert. In Neutrophilen Granulozyten und Eosinophilen Granulozyten ist die NOX_2 der NOX-Familie zu finden [15]. Unterstützung bekommt die NADPH-Oxidase von der fast ausschließlich in Neutrophilen Granulozyten vorkommenden Myeloperoxidase (MPO). Die MPO potenziert die Wirkung von Wasserstoffperoxid, indem sie es in reaktivere Metabolite, wie die Hydrochlorige Säure (HOCl) abbaut. Das Gegenstück zur MPO von Neutrophilen Granulozyten bildet die Eosinophile Peroxidase (EPO) in Eosinophilen Granulozyten [123, 204]. ROS besitzen eine hohe Reaktionsfreu-

digkeit gegenüber vielen Elementen und organischen Verbindungen, was in Gewebeerstörung resultiert [204].

1.4.2.5 Direkte Autoantikörper-vermittelte Gewebeerstörung

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Autoantikörper direkt zur Gewebeerstörung beitragen können, indem sie zum Beispiel durch Bindung die Funktion von BP-180 und BP-230 als Strukturproteine im Hemidesmosom inhibieren [191, 202, 235, 248]. Selbst eine Blockierung von intrazellulär gelegenen BP-230 durch Antikörper ist seit dem Beweis der Penetration von Antikörpern in lebende Zellen vorstellbar [4, 212]. *In vitro* kultivierte Keratinozyten reduzierten durch Inkubation mit BP-Patientenserum ihre BP-180 Moleküle [104, 169, 186]. Zusätzlich konnte *in vivo* F(ab')₂ Fragmente von Anti-humanen NC16A-Kaninchen Antikörper in neonatalen BP-180-humanisierten Mäusen zu Hautfragilität führen [186]. Zur Ausbildung der typischen BP-Manifestation mit Blasenbildung kam es alleine durch Autoantikörper nicht [217], es wird aber eine Anfälligkeit der DEJ gegenüber Inflammation vermutet [104].

1.5 Die Epidermolysis bullosa acquisita

1.5.1 Epidemiologie

Schon seit 1948 sind Fälle von EBA in der Literatur beschrieben [12]. EBA ist eine der seltensten blasenbildenden Autoimmundermatosen (Prävalenz: 1/1,3 Mio. in Deutschland, Inzidenz: 0,17-0,26/Mio.) [33, 119]. Aufgrund des kleinen Patientkollektivs sind die vorliegenden wissenschaftlichen Erkenntnisse und die Anzahl der verfügbaren Literatur geringer als beim bullösen Pemphigoid.

Mit einer leichten Prädominanz des weiblichen Geschlechts kann diese Erkrankung alle Altersgruppen betreffen [137]. In der Literatur sind verschiedene EBA-Typen beschrieben, welche hervorheben, wie klinisch heterogen EBA sich präsentiert. Dadurch besteht klinisch eine Verwechslungsgefahr mit anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen. Unterschieden werden der klassische (mechanobullöse) und entzündliche (inflammatorische) EBA-Typ. Bei dem entzündlichen EBA-Typ werden zusätzlich noch Unterformen,

wie die *bullous pemphigoid-like*, die *mucous membrane pemphigoid-like*, die *Brunsting-Perry pemphigoid-like* und die *linear IgA bullous dermatosis-like* EBA beschrieben [119]. Die klassische, mechanobullöse EBA wird in 30 - 50 % aller Fälle gefunden und beinhaltet eine fragile Haut, nicht inflammatorische Blasen, dystrophische Narben und Nägel sowie Milien [137, 268]. Die entzündliche, inflammatorische EBA ist durch entzündliche vesikobullöse Läsionen, ähnlich wie beim bullösen Pemphigoid, gekennzeichnet [119]. In einem Patientenkollektiv mit 38 EBA-Patienten trat in 37 % der Fälle der mechanobullöse Typ und in 63 % der inflammatorische Typ auf. Einige Autoren sprechen sich gegen eine strikte Trennung der Typen aus, da im Verlauf der Erkrankung mehrere EBA Typen vorliegen können [41, 229].

Außerhalb der Haut wurde das EBA-Antigen/Typ-VII-Kollagen (COL7) in der Cornea (Bowmansche Membran), der oralen Mukosa, dem Ösophagus, dem Chorioamnion, dem Gebärmutterhals und dem Analkanal durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen [42]. Es existieren Hinweise, dass EBA mit der Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sein kann, da in 25 % der EBA-Fälle ein Morbus Crohn auftritt [28, 137, 207]. *In vivo* zeigte sich im aktiven Tiermodell nach Immunisierung durch Injektion des Antigenes eine Antikörperablagerung im Gastrointestinaltrakt mit Inflammation [99].

1.5.2 Pathophysiologie

Bei EBA kommt es ähnlich wie bei BP als Ausdruck des peripheren Toleranzverlustes zur Ausbildung von autoreaktiven T_H-Zellen [180, 227] und Autoantikörpern gegen COL7 [34, 263]. Bei dem mechanobullösen, nicht-inflammatorischen EBA-Typ bildet sich ohne die histologische Anwesenheit von Entzündungszellen eine subepidermale Blasen aus [119]. Es wird eine direkte Autoantikörperwirkung, welche die Interaktion zwischen COL7 und anderen Strukturproteinen behindert, vermutet. Dies lässt sich aktuell nicht *in vivo* nachweisen [37, 39, 223, 229]. Bei dem inflammatorischen Typ kommt es nach Komplementaktivierung an den Autoantikörpern [71, 171, 232] zur Infiltration von hauptsächlich Neutrophilen Granulozyten, welche die Gewebeerstörung vermitteln [40, 171, 233]. Wie die Rekrutierung der Granulozyten zu Stande kommt und ob Mastzellen wie beim BP daran beteiligt sind, ist aktuell nicht geklärt [117].

1.5.2.1 Toleranzverlust

Autoreaktive T-Zellen gegen das Hauptepitop NC1 wurden bei EBA-Patienten identifiziert [180]. Dabei wird anhand des IgG Subklassen Profils im Patientenserum mit IgG1- und IgG4-Autoantikörpern von einer Rolle von T_H1- und T_H2-Zellen bei der Manifestation von EBA ausgegangen [227]. Für EBA ist bei Patienten eine Assoziation mit dem HLA-DR2-Allel festgestellt worden [69]. Insgesamt sind Erkenntnisse über die Rolle der T-Zellen beim Toleranzverlust von EBA aufgrund des kleinen Patientenkollektivs gering und leiten sich vorwiegend von den Tierversuchen ab [159]. Im aktiven EBA-Mausmodell waren athymische und damit T-Zell defiziente Mäuse gegen die Immunisierung mit dem murinen NC1 Antigen resistent [227]. Auch eine Depletion von CD₄ positiven T-Zellen schützte vor EBA im Tiermodell [103]. Zusätzlich konnte ein passiver Transfer von autoreaktiven T-Zellen gegen die murine NC1-Domäne in gesunden Mäusen zur EBA Ausbildung führen [33, 227]. Nach den detektierten IgG-Subklassen und dem Zytokinprofil liegen, wie bei Patienten, Hinweise für eine T_H1- und T_H2-Zellen Abhängigkeit beim aktiven EBA-Modell vor [33, 227]. *In vivo* wurde die T_H1-Zellen-Antwort als entscheidend für die Manifestation von EBA angesehen [83, 256].

1.5.2.2 Zielantigene

Bei EBA werden Autoantikörper gegen Typ-VII-Kollagen (COL7), einem Strukturprotein in der DEJ, gebildet. COL7 ist ein relativ großes Molekül (424 nm), das aus drei, von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten sezernierten, identischen α Ketten besteht [268]. Jede α -Kette besitzt einen zentralen kollagenen Bereich (145 kD), der N-terminal von dem großen nichtkollagenen NC1-Bereich (145 kD) und C-terminal vom kurzen nichtkollagenen NC2-Bereich (34 kD) flankiert ist. Im Westernblot wird ein 290 kD schweres Protein aus dem dermalen Extrakt oder zellularen Extrakt von Keratinozyten und Fibroblasten nachgewiesen [232]. Im Gesamtmolekül COL7 lagern sich die kollagenen Bereiche zu einer Triple-Helix zusammen [42].

In der DEJ sind immer zwei COL7-Moleküle über Disulfidbrücken antiparallel überlappend in ihren NC2 Bereichen gebunden. Immunelektronmikroskopisch entsteht so ein „U“-förmiges Gebilde, welches in der Lamina densa beginnend, mit seiner konvexen Seite, bis in die dermale Papillenschicht reicht und mit seinen Schenkeln weitere Kollagenfibrillen umschließt [42]. Nach dieser Modellvorstellung beginnen die aus COL7 gebildeten Anker

Fibrillen in der Lamina densa, was bedeutet, dass dort die NC1 Domänen anzutreffen sind [100, 166] (Abbildung 6).

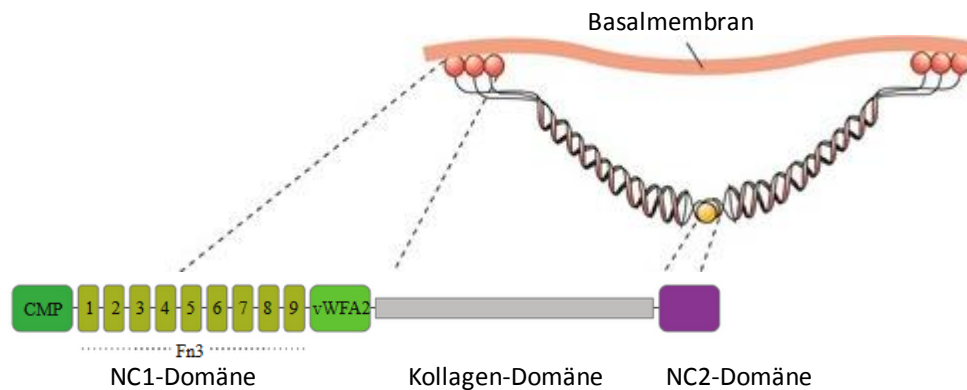


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur und Epitope von COL7 (modifiziert nach Kim et al. 2013 [118] und Ludwig et al. 2013 [157]). COL7 besteht aus drei α -Ketten, welche in die Bereiche NC1-Domäne, tripelhelikale, kollagene Domäne und NC2-Domäne unterschieden werden. In der NC2-Domäne binden zwei COL7-Moleküle aneinander. Die Bindung an weitere Strukturen der Basalmembran wird durch die NC1-Domäne erfüllt. Auf ihr sind 11 Epitope, die als CMP (*cartilage matrix protein*), Fn3 (*fibronectin 3*) und VWF-A (*von-Willebrand-factor-A*) Subdomäne bezeichnet werden, zu finden.

In der NC1-Region befinden sich Proteinstrukturen, die starke Homologien zu anderen körpereigenen Molekülen aufweisen. So sind N-terminal beginnend eine *cartilage matrix protein* (CMP), neun *fibronectin 3* (Fn3) und eine *von-Willebrand-factor-A* (VWF-A) Subdomäne anzutreffen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Subdomänen in der NC1-Region als Bindungsstellen für andere Strukturproteine, wie Laminin 332 (ehemals Laminin 5), Laminin 311 (Laminin 6) und Typ-IV-Kollagen dienen. Dadurch entsteht eine funktionelle Befestigung zwischen Epidermis und Dermis [37, 42].

Der Übergang vom kollagenen Bereich zur NC2-Region besitzt auf Aminosäuren-Level eine 100 % Homologie zwischen Mensch, Hamster und Maus. Es wird vermutet, dass der NC2-Bereich für die Initiierung des tripelhelikalen Aufbaus und für die Katalysierung der antiparallelen Bindung verantwortlich ist [39].

EBA-Autoantikörper erkennen hauptsächlich Epitope innerhalb der NC1-Domäne von COL7. Die Mehrzahl der EBA-Patientenseren bildeten mit einer rekombinant hergestellten humanen NC1-Domäne einen Immunkomplex *in vitro* aus [34, 263]. Aufgereinigtes Kaninchen-IgG, welches sowohl die humane und murine NC1-Domäne bindet, und EBA-Patientenseren konnten in haarlosen Mäusen eine EBA-Manifestation auslösen [268-269].

Neben diesem passiven Transfermodell konnte durch Immunisierung mit einem rekombinanten murinen NC1-Fragment ebenfalls EBA in einem aktiven Mausmodell induziert werden [159].

Die Epitope auf NC1 verteilen sich auf die gesamte Länge der Domäne [227] und entsprechen damit auch den bereits genannten NC1-Subdomänen: Fn3, VWF-A und CMP. Für jede Subdomäne konnte *in vitro* eine Reaktion mit EBA-Patientenserum nachgewiesen [135, 243, 263] und *in vivo* mit den korrespondierenden Autoantikörpern EBA im Tiermodell induziert werden [35, 103, 230, 233, 263, 269] (Abbildung 6). Ein Hauptepitop auf der NC1-Domäne wird in der Literatur nicht angegeben. Eine Korrelation zwischen der Subdomäne auf NC1 und dem klinischem Phänotyp besteht ebenfalls nicht.

Zusätzlich zu den Epitopen der NC1-Domäne wurden EBA-Autoantikörpern, die sich gegen die triple-helikale kollagene Domäne [39, 101, 241], die NC2-Region sowie gegen den Übergangsbereich zwischen dem kollagenen Teil und der NC2-Region richten, beschrieben [36, 100].

1.5.2.3 Autoantikörper

Im Serum von EBA-Patienten sind vorwiegend IgG1 und IgG4 anzutreffen [17, 227]. Am häufigsten werden die IgG-Subklasse IgG4, gefolgt von IgG1, dann IgG2 und anschließend IgG3 nachgewiesen [159]. Zusätzlich dazu existieren auch einige Fälle mit autoreaktiven IgA-Antikörpern [33].

1.5.2.4 Gewebeerstörung

Der Bildungsort der subepidermalen Blasen von EBA-Patienten wurde sowohl der Lamina lucida als auch, wie schon früher angenommen, der Lamina densa zugeordnet [230]. Dort in der DEJ findet sich eine lineare Ablagerung von IgG und Komplement [232]. Hinsichtlich des Komplements wird in der Literatur der Nachweis von C3, C5b und Membran-Angriff-Komplexen mit einer Häufigkeit von 40 % oder 100 % beschrieben. Im Gefrierschnitt-Assay mit EBA-Antikörpern und frischem Serum wurde die Bindungshäufigkeit von C3 an die DEJ im Vergleich mit 70 % angegeben [229]. Mäuse, die einen Mangel an Komplement-bindenden Antikörpern besitzen und C5-defiziente Mäuse sind vor der pathogenen Wirkung der EBA-Autoantikörper geschützt. Auch der Einsatz von pathogenen

F(ab')₂-Fragmenten löste keine Blasenbildung aus, da ihnen durch Abwesenheit des Fc-Teils die Bindungsstelle zwischen Antikörper und Komplementelement fehlt [230]. Auch eine Blockierung des alternativen Komplementsystem-Pfades und ein Mangel an Faktor B schützen bei experimenteller EBA vor Läsionen [171].

Beim inflammatorischen Typ von EBA finden sich vorwiegend Neutrophile Granulozyten und variable Anzahlen von eosinophilen Granulozyten und mononukleären Zellen in den subepidermalen Läsionen, ganz im Gegensatz zum nicht-inflammatorischen Typ, der nur die Antikörper, das Komplement und die subepidermale Blase gemeinsam hat [229]. Histologisch kommt es auch bei experimenteller EBA zu einer Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Läsionen [233]. Wie genau die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten zu Stande kommt und ob Mastzellen wie bei BP daran beteiligt sind, ist nicht geklärt. Im passiven Transfermodell zeigte sich eine Aktivierung von Mastzellen. Da auch bei Mastzell-defizienten Mäusen EBA simuliert werden konnte, wurden Mastzellen als nicht relevant für die Ausbildung der subepidermalen Blasen im Tiermodell angesehen [117].

Die aktivierten Granulozyten sezernieren nun unter anderem Enzyme und bilden radikale Sauerstoffspezies und zerstören somit die Bindungsstrukturen in der DEJ [171]. Dazu gehören, wie auch beim BP, die von Granulozyten sezernierte Neutrophilen Elastase und MMP-9 (Gelatinase B). Eine *in vitro* Blockierung der Enzyme verhinderte im Gefrierschnitt-Assay die Spaltbildung [159, 225, 252]. Im passiven EBA-Mausmodell sind NOX-defiziente Tiere gegen die Wirkung von pathogenen EBA-Antikörpern geschützt [40].

1.5.2.5 Direkte Autoantikörper-vermittelte Gewebeerstörung

Bisher wurde der inflammatorische Typ von EBA beschrieben, welcher durch eine Autoantikörper-induzierte Inflammation der DEJ, mit Komplement-Aktivierung, Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen gekennzeichnet ist. Bei dem mechanobullösen, nicht-inflammatorische EBA-Typ kommt es ohne die histologische Anwesenheit von Entzündungszellen zur subepidermalen Blasenbildung [119]. Diese Tatsache und weitere Hinweise, wie z. B. eine Neigung zur Blasenbildung an mechanisch beanspruchten Hautbereichen und nach Trauma, die Reduktion von Ankerfibrillen sowie ein Umbau der Lamina densa in periläsionaler und läsionaler Haut von EBA-Patienten, deuten auf einen nicht-inflammatorischen Mechanismus hin. Zum einen wird vermutet, dass die Interaktion

von COL7 und seinen Liganden direkt durch Antikörper-Anlagerung unterbrochen werden kann [229]. Durch Bindung an ihr Antigen können Antikörper z. B. die Bindung von Laminin 332 an die NC1-Domäne inhibieren [37]. Auch wird vermutet, dass Antikörper gegen die kollagene Domäne von COL7 deren antiparallele Anordnungen behindern und das Gesamtmolekül somit destabilisieren [39]. Bis jetzt fehlen aber Beweise für diese Theorien im Tiermodell. Die Versuche mit pathogenen EBA-F(ab')₂-Fragmenten oder pathogenen EBA-Hühner-Antikörper, die beide nicht das Komplement- oder FcR-System aktivieren können, im *in vivo* Tierversuch den mechanobullöse EBA-Typ zu induzieren, waren nicht erfolgreich [223, 229].

1.6 Diagnostik von BP und EBA

1.6.1 Klinische Manifestation

Beim bullösem Pemphigoid imponieren klinisch prall elastisch gefüllte Blasen auf normaler oder geröteter Haut, die mit Juckreiz (Pruritus) einhergehen [121, 134] (Abbildung 7). Sie lassen sich durch seitlichen Druck verschieben (positives Nikolski-II-Zeichen) und heilen nach mehreren Tagen als narbenfreie, krustöse Erosion ab [91, 121, 217, 231]. Als Prädilektionsstellen gelten das untere Abdomen, die Innenseite der Oberschenkel und Unterarme und die Intertrigines. In der Regel kommt es selten zu Läsionen auf Schleimhäuten, dann unter anderem in der Mundhöhle, an der Genitalschleimhaut und an den Konjunktiven [217]. In ca. 9 % der Fälle tritt ein immunhistologisch bewiesenes BP ohne Blasenbildung auf. An der Haut imponiert in dem Fall das klinische Bild eines Ekzems, einer Urtikaria oder eines Prurigo simplex subacuta [91, 121, 217]. Diese Krankheitsphase wird als nicht bullöse Prodromalphase vor dem blasenbildende Stadium gesehen [91]. Bei EBA können klinisch mehrere Phänotypen vorliegen, welche auch anderen blasenbildenden Autoimmundermatosen ähneln [119].



Abbildung 7: Klinisches Bild des bullösen Pemphigoids (nach Schmidt et al. [220]). Zu erkennen sind prallelastische Blasen, Erosionen und Krusten auf normaler und geröteter Haut eines Unterarmes.

Die klassische, mechanobullöse EBA beinhaltet eine fragile Haut mit nicht inflammatorische Blasen sowie dystrophische Narben, dystrophische Nägel und Milien [137, 268]. Sie tritt vor allem an Trauma gefährdeten Stellen des Körpers, wie Händen, Ellenbogen, Knien und Füßen auf. Die inflammatorische EBA ist durch entzündliche vesikobullöse Läsionen, hauptsächlich am Stamm und zentralen Körper, den Extremitäten, Hautfalten und den oralen Schleimhäuten gekennzeichnet [119]. Zusätzlich ist sie oft mit dem Auftreten von Pruritus verbunden [229]. Eine Schleimhautbeteiligung wurde in 58 % der Fälle unabhängig vom EBA-Typ nachgewiesen [24] (Abbildung 8).



Abbildung 8: Verschiedene Klinische Phänotypen der Epidermolysis bullosa acquisita (nach Kopecki et al. 2016 [125]). Das simultane Vorliegen von dystrophischen Narben und Blasen (A) und der Verlust von Fußnägeln (B) bei dem klassischen, mechanobullösen Typ. Inflammatorische Blasen am Rücken und den Armen bei der *bullous pemphigoid-like* EBA (C). Eine orale Beteiligung mit Schleimhautveränderung am Zungenrand bei der *mucous membrane pemphigoid-like* EBA (D). Lokalisierte Blasen auf der Gesichtshaut bei *Brunsting-Perry pemphigoid-like* EBA (E). Disseminierte Blasen am Gesäß bei *linear IgA bullous dermatosis-like* EBA (F).

1.6.2 Histopathologische Untersuchung

BP sowie EBA können nicht bioptisch eindeutig diagnostiziert werden, da theoretisch eine andere blasenbildende Autoimmundermatose mit ähnlichem Phänotyp vorliegen könnte. Hinweise auf das Vorliegen eines BP und dem inflammatorischen EBA-Typ sind der Nachweis einer subepidermalen Blasenbildung mit Infiltration von eosinophilen oder Neutrophilen Granulozyten [148, 229]. Um bei Fixation ein Verlust der Blasendecke zu verhindern wird in der Regel eine periläsionale Probe am Rand der Blase empfohlen [60] (Abbildung 9).

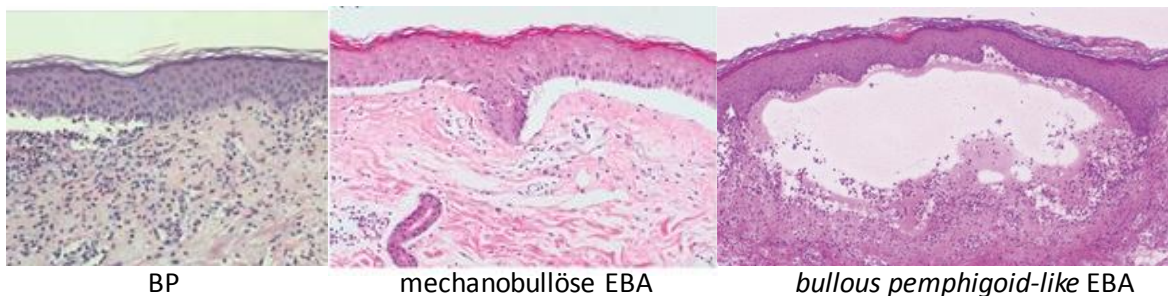


Abbildung 9: Histopathologie von BP und EBA (modifiziert nach Ishii et al. 2010 [98], Kim et al. 2013 [118] und Otten et al. 2014 [197]). Es liegen Hämatoxylin-Eosin gefärbte Hautschnitte von BP und EBA vor. Als Gemeinsamkeit ist immer die subepidermale Blase vorhanden. Bei der klassischen, mechanobullösen EBA liegt im Vergleich zu BP und der *bullous pemphigoid-like* EBA kein entzündliches Infiltrat vor.

1.6.3 Direkte Immunfluoreszenz (DIF)

Der Goldstandard der Diagnostik blasenbildender Autoimmundermatosen ist der Nachweis von gewebsgebundenen Autoantikörpern mittels DIF [220]. Durch den Einsatz von FITC-konjugierten Antikörpern gegen humane Antikörper (IgG, IgA, IgM) und Komplement (C3), können diese Bestandteile unter dem Fluoreszenzmikroskop im Hautbiopsat von Patienten nachgewiesen werden. Bei den Pemphigoid-Erkrankungen und der Epidermolysis bullosa acquisita sind lineare IgG-Ablagerungen in der DEJ vorhanden [220, 232] (Abbildung 10).

Bei der Probenentnahme wird empfohlen perläsional zu biopsieren, da in der Läsion durch enzymatische Abbauprozesse die Antikörper schon zerstört sein könnten und so falsch

negative Ergebnisse entstehen. Die Proben werden kältefixiert, mit einem Kryostaten in 6 μm dicke Hautstücke geschnitten und auf einem Objektivträger platziert [121, 231].

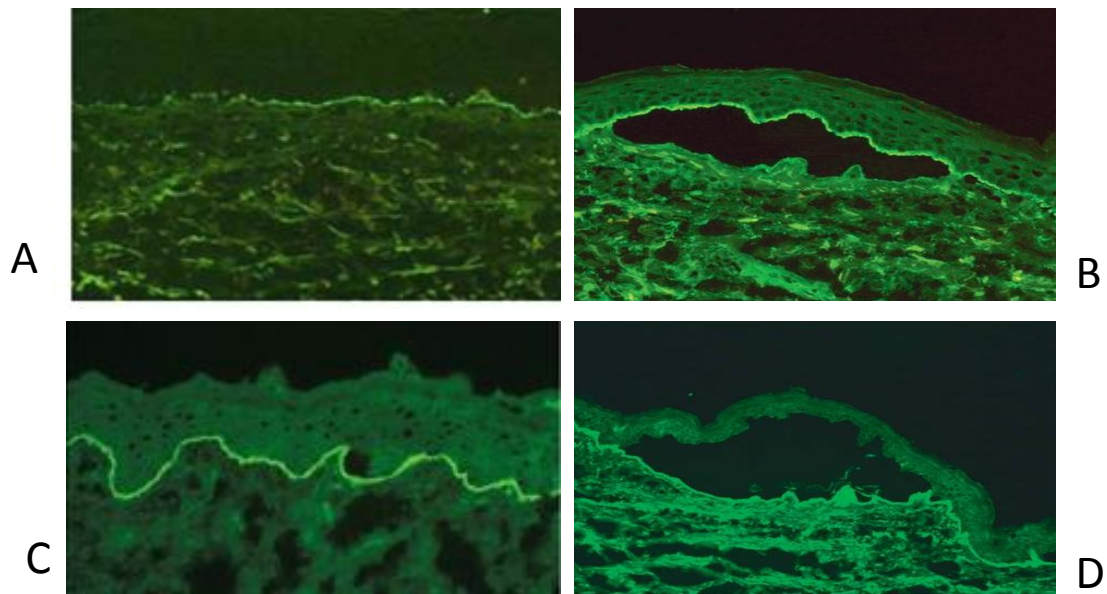


Abbildung 10: DIF und IIF von BP und EBA (modifiziert nach Schmidt et al. 2011 [220], Kim et al. 2013 [118] und Otten et al. 2014 [197]). In der Direkten Immunfluoreszenz bei BP (A; Blasendecke fehlt) und EBA (C) ist eine lineare Anreicherung von IgG in der DEJ nachzuweisen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz kommt es bei BP (B) zu einer Anreicherung von IgG am Dach der artifiziellen Blase und bei EBA (D) am Boden der Blase.

1.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IIF)-Mikroskopie lassen sich BP und EBA diagnostisch voneinander trennen. Als Substrate für die IIF kann gesunde humane Haut und Affenösophagus verwendet werden. Durch *salt-split-skin* Technik (SSST) wird durch eine 1 M NaCl-Lösung die humane Haut im Bereich der Lamina lucida gespalten, so dass die Antigene von BP und EBA räumlich voneinander getrennt sind [217, 231]. In dieser künstlich erzeugten Blase binden deshalb die Antikörper von BP in 90 % der Fälle am Dach der Blase (epidermal) und die Antikörper von EBA am Boden der Blase (dermal). Durch den Einsatz von anti-human-IgG-FITC-konjugierten Ziegenantikörpern wird im Fluoreszenzmikroskop der Bindungsort der Autoantikörper sichtbar [121] (Abbildung 10).

1.6.5 ELISA und Westernblot

Eine endgültig bestätigende Diagnostik bieten ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) und Westernblot (Immunoblot), welche mit rekombinanten Antigenen arbeiten, die von den Patienten Antikörpern erkannt werden. Durch eine Bindung an ihr Antigen können die damit nicht mehr abwaschbaren Antikörper durch ein anti-humanes IgG mit z. B. Peroxidase-Anhang in einer Farbreaktion sichtbar gemacht und die optische Dichte durch ein Photometer gemessen werden [121]. Für BP existiert ein hoch sensitiver NC16A-ELISA [279]. Mit dem ELISA-Verfahren lässt sich auch das „*epitop spreading*“ Phänomen, wo Autoantikörper multiple Epitope auf einem Antigen erkennen, zeigen [53]. Im ELISA wird bei EBA als Antigen eine rekombinante NC1-Region von COL7 verwendet [231]. Mit Hilfe von ELISA und Westernblot kann zusätzlich die Aktivität der Erkrankung bestimmt werden, da die Serum-Titer an Autoantikörpern mit der Krankheitsaktivität korrelieren [218].

1.7 Therapie

1.7.1 Bullöses Pemphigoid

Zur Therapie des bullösem Pemphigoids existiert seit Dezember 2014 von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) eine aktuell gültige S2k-Leitlinie: „Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des bullösen Pemphigoids“ bei der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) (AWMF Register Nummer 013-071) [60]. Die aktuelle AWMF-Leitlinie unterteilt zur stadiengerechten Therapie Patienten mit bullösem Pemphigoid in 3 verschiedene Schweregrade. Eine milde klinische Manifestation geht von < 10 % betroffene Körperoberfläche, eine mittelschwere klinische Manifestation von 10-30 % betroffener Körperoberfläche und eine schwere klinische Manifestation von > 30 % betroffenen Körperoberfläche aus. Generell wird bei jedem Schweregrad eine antiseptische Lokaltherapie der Hautveränderungen zur Vorbeugung von Superinfektionen empfohlen. Ebenso sollten große, mechanisch beeinträchtigende Blasen unter Erhalt des Blasendaches steril abpunktiert werden [60].

Jahrzehnte lang galten systemische Glukokortikoide als wichtigste Standardmedikamente bei der Therapie. Aufgrund der Häufigkeit von schweren Nebenwirkungen wurden ihnen ein großer Anteil an der hohen Mortalität von BP zugesprochen, sodass nach alternativen Therapiemöglichkeiten gesucht wurde [110].

Als wichtige Alternative gelten topische Glukokortikoide. Der Vergleich von topischen Glukokortikoiden (10-40 mg/d Clobetasolpropionat) mit oralen, systemisch wirkenden Glukokortikoiden (0,5-1 mg/kg/d Prednison) in einer großen klinischen Multicenter-Studie mit 341 BP-Patienten zeigte bei gleicher bis besserer Effektivität und geringerem Nebenwirkungsprofil eine Halbierung der Mortalität durch die Therapie mit topischen Glukokortikoiden [109-110, 259].

Nach AWMF-Leitlinie und Literatur kann bei mildem und lokalisiertem BP eine Monotherapie mit topischen Glukokortikoiden wie Clobetasolpropionat durchgeführt werden [60, 115, 259]. Eine Limitation der topischen Behandlung wird in der Durchführbarkeit gesehen, da eine zweimalige, tägliche, großflächige Anwendung notwendig ist und bei BP ein älteres Patientenkollektiv vorliegt [134].

Bei BP-Patienten mit mittelschwerer Manifestation kann, bei Patienten mit schwerer Manifestation sollte zu den topischen Glukokortikoiden eine zusätzliche systemische Therapie begonnen werden [60].

Zur Induktionstherapie bei bullösem Pemphigoid wird eine systemische Therapie mit einem Prednisolonäquivalent (initial 0,5 mg/kg/d) gegebenenfalls in Kombination mit einer immunsuppressiven/immunmodulatorischen adjuvanten Therapie empfohlen [60, 115, 259]. Eine Dosiserhöhung von Prednisolon über 0,75 mg/kg/d hat bei höheren Nebenwirkungen keinen weiteren Nutzen erreicht [174].

Als systemische alternative Monotherapie zu Prednisolon gelten Dapson p.o., Doxycyclin p.o. gegebenenfalls in Kombination mit Nicotinamid und Methotrexat p.o. oder s.c. Sie können auch, wie Mycophenolat-Mofetil und Azathioprin, als Kombinationspartner mit dem systemischen Glukokortikoid eingesetzt werden [60, 74, 259].

Falls durch dieses Therapie-Regime keine klinische Remission erreicht wird werden nach AWMF-Leitlinie Hochdosierte intravenöse Immunglobuline (2 g/kg/Zyklus), Immunadsorption/Plasmapherese und Rituximab empfohlen [220, 259]. Alternativ kann eine zusätzliche Therapie mit Cyclophosphamid und Anti-IgE-monoklonalen Antikörpern, wie Omalizumab, erwogen werden [60, 168, 270, 272].

Für den Einsatz von Tacrolimus anstelle von topischen Kortikosteroiden gibt es lediglich Einzelfallberichte, die derzeit eine Therapieempfehlung nicht rechtfertigen [60].

Das Ziel der sich anschließenden Konsolidierungstherapie ist neben der Kontrolle der Krankheitsaktivität ein schnellst mögliches Ausschleichen von systemischen Kortikosteroiden und gegebenenfalls der adjuvanten Immunsuppressiva.

Ist klinisch eine Remission erreicht, ist eine Reduktion von Prednisolon um ca. 25 % in 7-14-tägigen Schritten empfohlen. Unterhalb von 20 mg/d Prednisolonäquivalent wird eine langsamere Reduktion in 2-4-wöchigen Schritten empfohlen. Eine Erhaltungstherapie sollte unterhalb der Cushingschwelle (7,5 mg/d Prednisolonäquivalent) liegen [60].

1.7.2 Epidermolysis Bullosa Acquisita

Die Durchführung von klinischen Studien über Therapiemöglichkeiten bei EBA ist bei einem kleinen Patientenkollektiv durch das seltene Auftreten der Erkrankung erschwert. Des Weiteren ist EBA eine chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung mit unterschiedlichen Phänotypen. Die pathophysiologischen Unterschiede bei der Entstehung des mechanobullösen und inflammatorischen Typs lassen eine Notwendigkeit von unterschiedlichen Therapieansätzen vermuten [119]. Zusätzlich gilt die Erkrankung als therapierefraktär gegenüber der konventionellen Immunsuppressionstherapie [28, 33]. Die Nebenwirkungen durch die unspezifische systemische Immunsuppression, wie z. B. durch Glukokortikoide tragen zur Morbidität und Mortalität der Patienten bei [33]. Auf der einen Seite wird von einem guten Therapieansprechen bei der Verwendung von erhöhten Glukokortikoid Dosen (Prednisolon-Dosis nach Äquivalenzschätzung von > 10 mg/d) [119] berichtet, auf der anderen Seite gelten Glukokortikoide als ineffektiv und sind damit mit einem ungünstigen Nutzen-Nebenwirkungs-Profil behaftet [78, 119, 137].

Aktuell existiert keine deutsche Leitlinie zur Therapie der Epidermolysis bullosa acquisita. Ein *First-Line*-Therapieschema basiert auf der Leitlinie der „*British Association of Dermatologists*“ von 2002. Es wurde eine Kombination aus Prednisolon (1-2 mg/kg/d; je nach Schweregrad reduzierbar; alternativ: Dexamethason i.v. Pulstherapie 100 mg/d für 3 Tage, jede 3 Wochen), Azathioprin oder Mycophenolat-Mofetil und Colchicin empfohlen [220]. Ein signifikanter Unterschied der Remission bei Therapie von unterschiedlichen EBA-Phänotypen konnte nicht gezeigt werden [119]. Des Weiteren werden in der Literatur Therapievorschlage nach dem Grad der klinischen Manifestation gegeben. Es wird von Dapson, Sulphapyridinen und Colchicin bei milden Formen von EBA und von Cyclospori-

nen, Mycophenolat-Mofetil, Rituximab, intravenösen Immunglobulinen (IVIG) und extrakorporaler Photochemotherapie bei resistenten und schweren Formen von EBA berichtet [137].

Eine Kombination der Therapie mit Biologicals, wie Daclizumab (Anti-Interleukin 2 Rezeptor/ Anti-CD₂₅) [59], Infliximab (Anti-TNF α) [98] und Rituximab (Anti-CD₂₀) [196] hat in einzelnen Fällen zu einer Remission von therapierefraktären EBA oder zu einem Cortison-sparenden Effekt geführt. Auch eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIG) war bei EBA-Patienten erfolgreich, gilt aber weiter als *off-label use* [26, 61, 75, 78, 170].

Erkenntnisse aus der Pathophysiologie von EBA führten kürzlich zu potentiellen neuen Therapiestrategien. Die Phosphodiesterase (PDE) 4 ist bei EBA-Patienten in Granulozyten und der Haut deutlich erhöht. Da das Enzym als ein Element in der Signalkaskade zur Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten nach Autoimmun-Immunkomplex Bindung benötigt wird, bot sich der Einsatz von PDE4-Inhibitoren an. Eine antiinflammatorische Wirkung zeigte sich *in vitro* und *in vivo* beim aktiven EBA-Modell [124]. Bei Patienten wird dieser Wirkstoff noch nicht eingesetzt.

Ebenso ergeben sich durch gezielte Beeinflussung des Heat Shock Protein (HSP) Systems anti-inflammatorische Effekte. Durch Blockierung von HSP90, einem Chaperonmolekül für diverse Protein-Klienten, unter anderem auch Elementen von inflammatorischen Signalkaskade, führt bei experimenteller EBA zur Krankheitsremission [114, 250].

Für die Epidermolysis bullosa acquisita bedarf es weiterer experimenteller und klinischer Studien, um ein potentes, Leitlinien-gerechtes, Glukokortikoid- und Nebenwirkungs-armes Therapiekonzept zu entwickeln. Aufgrund der geringen Krankheit-Inzidenz liegt das Augenmerk bei den aktuellen Tiermodellen, besonders dem aktiven, durch Immunisierung induziertem, EBA-Modell [156].

1.8 Verwendete immunmodulatorische Wirkstoffe

Im Folgenden werden die drei in dieser wissenschaftlichen Arbeit verwendeten immunmodulatorischen Wirkstoffe vorgestellt.

1.8.1 Intravenöse Immunglobuline (IVIG)

Intravenöse Immunglobuline (IVIG) sind ein Produkt aus dem gepoolten Plasma von 10.000 bis 20.000 gesunden Spendern und bestehen neben geringen Anteilen von IgA und IgM hauptsächlich aus Immunglobulinen der Antikörperklasse IgG [46, 107]. Das hier verwendete IVIG-Präparat Intratect[®] hat laut Arzneimittelbeilagezettel folgende Verteilung von IgG-Subklassen: IgG1 57 %, IgG2 37 %, IgG3 3 %, IgG4 3%.

Intratect[®] ist in Deutschland für eine Substitutionstherapie bei primärem und sekundärem Antikörpermangelsyndrom sowie zur Immunmodulation bei Autoimmunerkrankungen wie der Idiopathischen Thrombozytopenischen Purpura (ITP), dem Guillain-Barré-Syndrom und dem Kawasaki-Syndrom indiziert [170]

Nach der aktuellen AWMF-S2k-Leitlinie: „Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris/foliaceus und des bullösen Pemphigoids“ der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) wird IVIG als *second-line* Therapie bei einem therapierefraktären Krankheitsverlauf des bullösen Pemphigoids in Kombination empfohlen [60].

Die bei der Therapie von IVIG anfallenden hohen Kosten sollten seinen Einsatz aufgrund des günstigen Nebenwirkungsprofils nicht limitieren. In Vergleichen mit anderen Präparaten wird angenommen, dass durch geringe Kosten der Nebenwirkungstherapie die Gesamtkosten des IVIG-Einsatzes sogar geringer bleiben [62, 214].

Die Nebenwirkungen von IVIG werden als mild und selbst limitierend bezeichnet und treten 30 bis 60 min nach Infusion auf. Unter anderem wurden Flush, Myalgie, Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Rückenschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Brustengegefühl, pfeifendes Atemgeräusch, Blutdruckveränderungen und Tachykardie nachgewiesen. Eine Reduzierung der Infusionsgeschwindigkeit oder die Gabe von Glukokortikoiden oder Antihistaminika kann das Auftreten von unerwünschten Wirkungen reduzieren. Es sind keine Medikamenteninteraktionen mit IVIG bekannt. Als schwere unangenehme Nebenwirkungen können gelegentlich bis selten ein akutes Nierenversagen, hämolytische Anämien, thrombembolische Ereignisse, aseptische Meningitiden und Arthritiden auftreten.

Vor einer Therapie sollten Patienten auf ein IgA-Defizit durch Anti-IgA-Antikörper gescreent werden, da in diesem Fall das Risiko einer anaphylaktischen Reaktion erhöht ist [46, 62, 170, 214].

Das Risiko einer Übertragung von z. B. HIV und Hepatitis C wird durch verschiedene Reinigungsschritte und Screeninguntersuchungen bei der Produktion niedrig gehalten [63, 170].

1.8.2 Dimethylfumarat (DMF)

DMF, umgangssprachlich auch als Fumarsäure bezeichnet, wird seit ca. 50 Jahren für die orale Behandlung der Psoriasis (Schuppenflechte), einer Systemerkrankung unklarer Ätiologie, die sich als entzündliche Dermatose manifestieren kann, eingesetzt [178, 181].

Bei der Langzeitbehandlung von Psoriasis-Patienten traten relativ milde Nebenwirkungen auf: Flush, Diarrhö, Übelkeit, Müdigkeit, reversible Transaminasenerhöhung, Lymphozytopenie und Eosinophilie [5, 177, 194]. Aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung und dem günstigen Nebenwirkungsprofil, bietet sich der Einsatz bei anderen chronischen inflammatorischen Erkrankungen, wie z. B. der Multiple Sklerose an [94, 199]. Tecfidera[®] ist als DMF-Reinpräparat zur Therapie der schubweise remittierenden Multiplen Sklerose zugelassen. Unter der Therapie kam es in vier Fällen weltweit zum Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML), einer schweren Virus-assoziierten Erkrankung des Zentralen Nervensystems bei in der Regel immunsupprimierten Patienten. Der einzige Risikofaktor wird in einer Tecfidera[®] induzierten persistierenden Lymphopenie gesehen. Eine regelmäßige Bestimmung der Leukozyten- und Lymphozytenzahl wird empfohlen [45, 146].

1.8.3 Heat Shock Protein 90-Inhibitor 17-DMAG

Heat Shock Proteine (HSP) sind über die Evolution stark konservierte, ubiquitär in Zellen von Eukaryoten vorkommende Proteine, die an vielen verschiedenen wichtigen Zellabläufen, wie Zellproliferation, Zellüberleben und Antwort auf Zellstress beteiligt sind [84, 108, 260]. Wichtige Vertreter sind das 90 kD schwere HSP90 und das 70 kD große HSP70 Protein. Von HSP90 sind 5 Isoformen bekannt, von denen HSP90 α und HSP90 β am

häufigsten intrazellulär vorkommen [43]. Neben ihrer Funktion als Chaperone bei Proteinsynthese und Proteintransport haben sie als intrazelluläre HSPs eine hauptsächlich zellprotektive Aufgabe und erlauben es Zellen potentiell letale Situation, wie z. B. Hitze oder anderen Zellstress, zu überleben [130, 161]. Im Falle des HSP90 sind mehr als 100 „Protein-Klienten“ bekannt, die mit dem HSP eine Bindung eingehen [43, 203]. In stressreichen Situationen kann dieser Komplex die gebundenen Proteine stabilisieren und schützen. Da auch viele Onkogene in Krebszellen mit HSP90 eine Bindung eingehen und gleichzeitig in Krebszellen HSP90 und HSP70 überexprimiert wird, bot sich für die Onkologie eine Inhibition von HSP90 an. Als Resultat davon werden HSP90-Inhibitoren zur Therapie maligner Erkrankungen getestet [96, 108, 120].

Eines der ersten beschriebenen HSP90-Inhibitoren ist Geldanamycin, welches aufgrund seiner Toxizität nicht zur Behandlung nutzbar ist. Nebenwirkungs-arme, potentere Derivate von Geldanamycin sind *17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin* (17-AAG) und *17-Dimethylaminoethylamino-17-Demethoxygeldanamycin* (17-DMAG) [96, 120, 236]. In der Onkologie befindet sich 17-DMAG zurzeit in Phase I Studien [131, 198, 206]. Die Studien gehen von einer generellen guten Verträglichkeit von 17-DMAG aus. Unter anderem wurde von Leberenzymerrhöhung, Pneumonitis, Diarrhö, Übelkeit, Anorexie, okulären Störungen, Fatigue, Myalgie und Thrombozytopenie als Nebenwirkungen berichtet. Als dosislimitierende Toxizitäts-Nebenwirkungen gelten periphere Neuropathie und renale Dysfunktion [131, 198, 206].

Durch seine Chaperonfunktion wird HSP90 ein Einfluss auf inflammatorische Signalkaskaden zugesprochen. So konnte bei BP-Patienten eine intrazelluläre Erhöhung von HSP90 in den Hautläsionen nachgewiesen werden [251, 253]. Zusätzlich führt eine Blockierung von HSP90 bei der experimenteller EBA zur Krankheitsremission [114, 250].

1.9 Ziel der Arbeit

In dieser wissenschaftlichen Arbeit werden die Effekte von drei verschiedenen immunmodulatorischen Wirkstoffen auf die Immunkomplex-induzierte-Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten untersucht. Es werden mit dem Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay zwei Versuchsmodelle benutzt, welche die Pathologie der bullösen Autoimmunerkrankungen: BP und EBA *in vitro* nachstellen. Die Therapie beider Autoimmunerkrankungen geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher [33, 110]. Dies liegt unter anderem an der Verwendung von Glukokortikoiden, welche zurzeit in der Therapie von bullösen Autoimmunerkrankungen als potentes Immunsuppressiva unentbehrlich sind. Ein Ziel meiner Arbeit ist darum, nebenwirkungsarme, potente Alternativen zu den verwendeten Glukokortikoiden zu finden. Zusätzlich sollen Hinweise auf die Wirkmechanismen der hier getesteten Substanzen: Dimethylfumarat (DMF), intravenöse Immunglobuline (IVIG) und Heat Shock Protein 90 Inhibitor (17-DMAG) aufgedeckt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Laborgeräte

Airsterilisator US PATS	<i>Binder GmbH, Tuttlingen</i>
Analysewaage Analytical Plus	<i>Ohaus Corporation, New Jersey, USA</i>
Biophotometer 8,5 mm	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Bio Vortex V1	<i>lab4you GmbH, Berlin</i>
Eindeckautomat Leica CV 5030	<i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i>
Elektrische Feinwaage PT 150	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
Eppendorf Pipetten	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Feuchtigkeitskammer	<i>Werner Hassa GmbH, Lübeck</i>
Gefrierkombination (+ 4°C, -20 ° C)	<i>Liebherr International AG, Bulle, Schweiz</i>
Gefriertruhe C660 (-80 ° C)	<i>New Brunswick Scientific, England</i>
Inkubator, WTC	<i>Binder, Tuttlingen</i>
Kühlkammer	<i>Viessmann GmbH & Co. KG, Allendorf</i>
Kryostat Leica CM 3050 S	<i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i>
Magnetrührer IKA ® RH basic 2	<i>IKA ® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Mikroplattenwascher, Columbus Pro	<i>Tecan, Männerdorf, Switzerland</i>
Mikroskop Wilovert S	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i>
Mikroskop Olympus BX40	<i>Olympus Deutschland GmbH, Hamburg</i>
Neubauer Zählkammer	<i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i>
pH-Meter ph526	<i>MultiCal WTW, Weilheim</i>
Pipettierhilfe, pipetus®-akku	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt</i>
Sterilbank, Biowizard Kojair	<i>W. H. Mahl, Reinraumtechnik GmbH, Magdeburg</i>
Testplattenmischer, TPM4	<i>Sarstedt AG & Co. Nuembrecht</i>
Rütteltisch TPM4	<i>Sarstedt</i>
Vortex Genie 2	<i>Scientific Industries, Bohemia, New York, USA</i>

Victor3 1420 Multilabel Counter	<i>Perkin Elmer, Rodgau</i>
Wasserbad, Aqualine	<i>LAUDA, Lauda-Königshofen</i>
Wasserstrahlpumpe	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
Zentrifuge, Varifuge 3.0 R	<i>Haereus Instruments GmbH, Hanau</i>
Zentrifuge, Mikro 20	<i>Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Acetate Foil for Microtest well plates	<i>Sarstedt Inc., USA</i>
Alu-Folie	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Centricon-Röhrchen, Amicon® Ultra-15, 15ml	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Deckgläser 24 x 60 mm	<i>Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig</i>
Einbettungsmedium Tissue-Tek® <i>Sakura Finetek Europe B.V.</i> ,	<i>Zoulerwoude, Niederlande</i>
Einmal-Kanülen BD Microlance 3	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Einmal-Skalpell	<i>Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan</i>
Erlenmeyerkolben	<i>A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg</i>
Färbe-Küvette	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Mikroplatte 96-well Plate LUMITRAC 600	<i>Greiner Bio-one, Solingen</i>
Flat Bot, White, High Bind	
Objektträger 26 x 76 mm/ca. 1mm	<i>Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg</i>
Objektträger SuperFrost /Plus	<i>Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig</i>
Ölstift, DAKO Pen	<i>DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark</i>
Parafilm M Laboratory Film	<i>Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin, USA</i>

Perfusionsbesteck BD Valu-Set	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Tissue culture Dish (Petrieschale)	<i>Sartstedt Inc., USA, Newton</i>
SafeSeal Reagiergefäße 1 ml, 2 ml	<i>Sarstedt AG & Co. Nuembrecht</i>
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	<i>Sarstedt AG & Co. Nuembrecht</i>
Spritzen 20 ml (BD Discardit II)	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Styroporkasten	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>

2.1.3 Chemikalien und Farbstoffe

Ammoniak-Lösung	<i>Merck KgaA, Darmstadt</i>
Aqua dest.	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
Dextran T 500	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Distilled water (steril), Gibco®	<i>Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Doppelt destiliertes H ₂ O: ddH ₂ O	<i>Apotheke, UKSH, Campus Lübeck</i>
Essigsäure-Alkohol	<i>Merck KgaA, Darmstadt</i>
Fetal Bovin Serum	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Ethanol 70 %, 100 %	<i>Apotheke UKSH, Campus Lübeck</i>
FMLP (N-Formyl-Met-Leu-Pro)	<i>Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Formaldehyd-Lösung 5 %	<i>Merck KgaA, Darmstadt</i>
Hämatoxylin	<i>Merck KgaA, Darmstadt</i>
Luminol, (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione free acid)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>J.T. Baker, Deventer-Holland</i>
Polymorphprep™	<i>Axis-Shield PoC, Oslo, Norway</i>
Trypan Blue	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Xylol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>

2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamine	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria</i>
-----------------------------------	---

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamine und 25mM HEPES, BioWhittacker® 1640	<i>Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland</i>
Dulbecco's PBS (steril), Gibco®	<i>Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt</i>
Blockingpuffer (4 °C):	PBS mit 1 % Biotin freiem BSA und 0,05 % Tween
Coatingpuffer	Natriumcarbonatpuffer 0.05M, pH 9,6)
Halbmedium	RPMI 1640 Medium mit L-Glutamine und 25 mM HEPES 1:2 mit LPS freiem ddH ₂ O verdünnt
Lysepuffer	DPBS ohne LPS 1:5 mit LPS freiem ddH ₂ O verdünnt
PBS 1-fach	8 g/l NaCl, 0,2g/l KCl
Waschpuffer	PBS mit 0,05 % Tween

2.1.5 Verwendete Pharmaka, Antigene und Antikörper

17-DMAG, (17-(Dimethylaminoethylamino) -17-demethoxygeldanamycin)	<i>InvivoGen, San Diego, USA</i>
Dimethyl fumarate 97 %	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
hcol7 E-F (rekombinantes COL7 Antigen)	<i>Labor AG bullöse Dermatosen, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Uni Lübeck</i>
Heparin-Natrium-25.000	<i>ratiopharm GmbH, Ulm</i>
IVIG (Intratect ® 50 mg/ml Infusionslösung)	<i>Biotest Pharma GmbH, Dreieich</i>
rekombinantes NC16A His Antigen	<i>Euroimmun, Lübeck</i>
rekombinante, monoklonale, chimere anti COL7 IgG1 und IgG4 Antikörper	<i>Labor AG bullöse Dermatosen, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Uni Lübeck</i>

Experimente mit menschlichem Material

Alle Patienten und gesunde Freiwillige wurden schriftlich und mündlich aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterschrieben. Für die Verwendung von Serum, Haut und Leukozyten von Patienten und Spendern lagen keine Bedenken der hiesigen Ethikkommission vor (Aktenzeichen 04-061; 04-144; 05-056; 09-140).

Humane Antikörper

BP-Patienten-Antikörper

Es wurden insgesamt 13 BP-Patientenseren für den Gefrierschnitt-Assay (GA) und ROS-Freisetzung-Assay (RFA) verwendet (Tabelle 2). Nicht mitgezählt sind die BP-Patientenseren aus den Vorversuchen zur Untersuchung des Spaltbildungs- und ROS-Freisetzung-Potentials. Bei 3 Patienten wurden jeweils 2 Serumproben von unterschiedlichen Zeiten verwendet (gleicher BP-Patient: BP1 und BP2, BP3 und BP4, BP5 und BP6). Die Patientenzahl lag damit bei 10. Davon waren 7 Patienten weiblich und 3 Patienten männlich. Das Patientenalter reichte von 61-89 Jahren und lag im Durchschnitt bei 81 Jahren. In dem Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität Lübeck wurden nach klinischem Verdacht durch DIF und immunoserologische Verfahren, wie IIF und BP180-NC16A-ELISA die Autoantikörper nachgewiesen. Damit wurde die Diagnose bullöses Pemphigoid gestellt. Für alle Patienten liegt ein BP180-NC16A-ELISA vor. Bei einigen Patienten existieren zusätzlich Ergebnisse aus DIF und IIF. Bei der DIF konnten in nicht läsionaler Hautbiopsien der Patienten, unter dem Fluoreszenzmikroskop, lineare IgG und Komplement (C3) Ablagerungen in der DEJ nachgewiesen werden. IgG-Autoantikörper im Patientenseren banden in der IIF im Bereich der DEJ an Affenösoophagus oder gesunder humaner Haut. In der *salt-split-skin* Technik (SSST) lagerten sich die Antikörper am Dach (epidermal) der artifiziell hergestellten Blase ab.

Die Antikörper Titer von BP180-NC16A-Antikörpern wurden im ELISA in U/ ml angegeben und reichten von 507-8350 U/ml. Im Durchschnitt lag der BP180-NC16A-Titer bei 2990 U/ml. Ein Einschlusskriterium für Patientenseren war ein Titer ≥ 500 U/ ml. Es konnte ein direkt proportionales Verhalten zwischen der prozentualen dermo-epidermalen Spaltbildung im GA und der Höhe der ELISA-Titer ab 500 U/ml nachgewiesen werden

[95]. Ab diesem Titer war eine für die Versuche brauchbare dermo-epidermale Spaltbildung zu erwarten.

Tabelle 2: Verwendete BP-Seren					
BP Seren	Alter	Geschlecht	BP180 NC16A-ELISA (U/ml)	DIF	IIF (Ösophagus u. SSST)
BP1	79	w	507	IgG und C3 Nachweis in DEJ	nicht durchgeführt
BP2	78	w	638	IgG und C3 Nachweis in DEJ	nicht durchgeführt
BP3	67	w	703	IgG und C3 Nachweis in DEJ	nicht durchgeführt
BP4	67	w	596	IgG und C3 Nachweis in DEJ	nicht durchgeführt
BP5	81	m	5673	IgG und C3 Nachweis in DEJ	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)
BP6	81	m	8271	IgG und C3 Nachweis in DEJ	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)
BP7	89	w	1245	IgG und C3 Nachweis in DEJ	nicht durchgeführt
BP8	85	w	1278	nicht durchgeführt	IgG und IgA Nachweis, (SSST: epidermal)
BP9	78	m	1299	nicht durchgeführt	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)
BP10	80	w	8350	nicht durchgeführt	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)
BP11	87	m	3813	nicht durchgeführt	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)
BP12	61	w	3909	IgG und C3 Nachweis in DEJ	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)
BP13	80	w	905	nicht durchgeführt	IgG Nachweis, (SSST: epidermal)

EBA-Patienten Antikörper

EBA ist eine seltene Erkrankung [33, 119]. Deshalb standen für den EBA-Gefrierschnitt-Assay nur wenige Patientenseren zur Verfügung. Insgesamt wurden Seren von 2 EBA-Patienten verwendet. Zusätzlich lag beim EBA2-Serumspender Plasma aus der Plasmapherese-Behandlung vor. Dieses konnte aufgereinigt ebenfalls für den GA benutzt werden (Tabelle 3). Im Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität Lübeck wurde die Diagnose EBA gestellt. IgG-Antikörper aus den EBA-Patientenseren konnten in der IIF im Bereich der DEJ an Affenösophagus oder gesunder humaner Haut binden. In der *salt-split-skin* Technik (SSST) banden die Antikörper am Boden (dermal) der artifiziell hergestellten Blase. Im Westernblot (Immunoblot) reagierten die Antikörper mit der rekombinanten NC1-Domäne des COL7.

Tabelle 3: Verwendete EBA-Seren				
EBA Seren	Alter	Geschlecht	IIF (Ösophagus u. SST)	Westernblot
EBA1	67	m	IgG Nachweis, (SSST: dermal)	Nachweis IgG4 gegen COL7
EBA2	52	w	IgG Nachweis, (SSST: dermal)	Nachweis IgG gegen COL7
Plasmapherese-EBA2	52	w	siehe EBA2	siehe EBA2

Humanes Kontrollserum und vitale Leukozyten von gesunden Probanden

Die freiwilligen Spender durften anamnestisch keine akuten und chronisch-entzündlichen Erkrankungen besitzen und Medikamente einnehmen. Humanes Kontrollserum für die Herstellung der Negativkontrolle entstammt aus dem Überstand von zentrifugierten Serumröhrchen. Zur Gewinnung der Leukozyten wurde zur Antikoagulation Heparinversetztes Vollblut verwendet. Insgesamt gab es 17 Leukozytenspender bei dem GA, davon 11 weibliche und 6 männliche Personen. Bei dem RFA spendeten ebenfalls 17 Probanden, davon 10 Frauen und 7 Männer.

Hautproben

Die kältefixierte humane, gesunde Haut ist neonatale Vorhaut und entstammt kinderchirurgischen Routineeingriffen.

2.2 ROS-Freisetzungs-Assay

2.2.1 Grundprinzip der ROS-Freisetzungs-Assays

Neutrophile Granulozyten produzieren in Aktivierungszuständen radikale Sauerstoffspezies (*reaktive oxygen species release/ROS-Release*), die an der Gewebeerstörung beteiligt sind [123, 183]. Durch Messung der ROS-Freisetzung im ROS-Freisetzungs-Assay (RFA) lässt sich so die Aktivität der Neutrophilen Granulozyten ableiten und eine mögliche Hemmung beobachten.

Der ROS-Freisetzungs-Assay ist ein ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). In den Vertiefungen (Wells) einer MicroWell-Platte gebundene Immunkomplexe aktivieren gesunde Neutrophile Granulozyten. Die Menge der ROS-Freisetzung kann durch Einsatz eines Chemolumineszenz-fähigen Indikatorstoffes photometrisch gemessen werden. Bei dem Versuch wurde Luminol verwendet, welches bei Anwesenheit von radikalen Sauerstoffspezies zur Emission von blauem Licht (Chemolumineszenz) fähig ist (Abbildung 11). Insgesamt ist die ROS-Freisetzung ein dynamischer Vorgang, der nach dem Start der Reaktion zunächst zunimmt, einen Peak erreicht und anschließend im Verlauf kontinuierlich abnimmt. Um diese zeitliche Entwicklung darzustellen, muss die MicroWell-Platte 60 Mal im Photometer gemessen werden.

Eine Messreihe bestand aus 12 Wells für 6 doppelt bestimmte Zustände: Positivkontrolle, Negativkontrolle, drei unterschiedlichen Konzentrationen des Pharmakons und der FMLP-Lösung (*N-formyl-Met-Leu-Pro*).

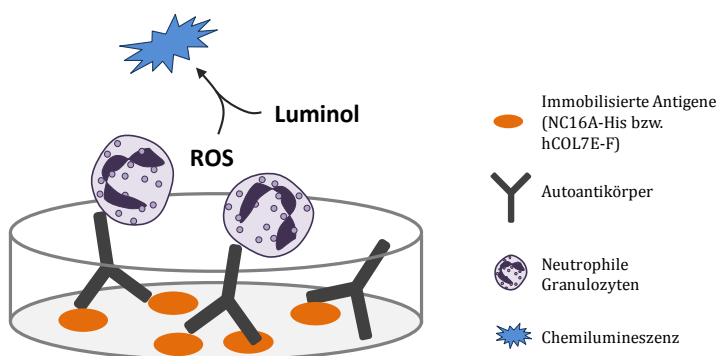


Abbildung 11: Schematische Darstellung des ROS-Freisetzungs-Assays.

Insgesamt befanden sich 5 Messreihen auf der ELISA-Platte was somit 60 zu messenden Wells entspricht. In allen Wells waren Antigene am Boden der Vertiefung gebunden, aber

nur in den Positivkontrolle und den Pharmakon-Wells befanden sich vollständige Immunkomplexe. Die Negativkontrolle bestand nur aus Zellsuspension und Antigen. In den Wells mit FMLP-Lösung wurden die Neutrophilen Granulozyten durch das Chemotaxin FMLP Antikörper-unabhängig zur ROS-Freisetzung angeregt. Die FMLP-Wells stellten damit eine weitere Positivkontrolle anderer Qualität dar.

2.2.2 Verwendete Autoantikörper

Der RFA wurde mit zwei Pharmaka durchgeführt: intravenösen Immunglobulinen (IVIG) und 17-DMAG (HSP90-Inhibitor). IVIG wurde in 10 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml Konzentrationen und 17-DMAG in 10 µmol/l, 100 µmol/l und 250 µmol/l Konzentrationen eingesetzt.

Bei dem IVIG-RFA wurde pro MicroWell-Platte ein BP-Antigen (rekombinantes NC16A His) und verschiedene BP-Antikörper (Patientenserum) verwendet. Die Neutrophilen Granulozyten stammten pro MicroWell-Platte vom gleichen Spender.

Im HSP90-Inhibitor-RFA wurde auf jeder MicroWell-Platte das gleiche EBA-Antigen (rekombinantes hCol7E-F) und der gleiche EBA-Antikörper (rekombinanter, monoklonaler, chimärer anti COL7 Antikörper) eingesetzt. Monoklonale EBA-Antikörper waren aus Mangel an Patientenserum notwendig. Die Neutrophilen Granulozyten entstammten pro Versuchsreihe von unterschiedlichen Spendern.

2.2.3 Coating der MicroWell-Platte und Bildung der Immunkomplexe

Zur Beschichtung (Coating) der MikroWell-Platte wurden die Antigene mit Natriumcarbonatpuffer verdünnt und mit einer Mehrkanalpipette 50 µl pro Well aufgetragen. Unter kontinuierlichem Schütteln wurden die mit Folie abgedeckten MicroWell-Platten für 3 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, damit das Antigen an der Wand der Wells fixiert werden konnte. Anschließend erfolgte eine Spülung der Platten im ELISA-Washer mit Waschpuffer. Die MicroWell-Platten wurden mit Blockingpuffer abgedeckt über Nacht (>13 Stunden) bei 4 °C schüttelnd aufbewahrt.

Die Verdünnung der BP-Seren erfolgte orientierend an Ergebnissen aus Vortests im Verhältnis 1:20-1:320 mit Blockingpuffer.

Bei den 17-DMAG ROS-Freisetzungs-Assays wurden ein monoklonaler humaner IgG1- und IgG4-EBA-Antikörper benutzt, welche 1:325-fach und 1:750-fach mit Blockingpuffer verdünnt wurden. 100 µl der Antikörper Lösungen wurden zu den Wells der Positivkontrolle und Pharmakas pipettiert. Die FMLP und Negativkontrolle-Wells erhielten eine äquivalente Menge an Antikörper-freiem Blockingpuffer.

Die Platten wurden nun mit einer Folie beklebt und 1-2 Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur belassen.

2.2.4 Aufreinigung von Neutrophilen Granulozyten mit Polymorphprep®

Die Zellen entstammten aus EDTA- Röhrcchen (9 ml) mit venösem Vollblut von gesunden, freiwilligen Probanden. Daraus wurden 4,5 ml Vollblut langsam mit einem Pipetus auf 4,5 ml Polymorphprep® in einem 15 ml Falcon-Röhrcchen pipettiert, so dass keine Vermischung der beiden Schichten stattfand. In einer anschließenden Zentrifugation wurde das Vollblut über 35 min bei Raumtemperatur, 417 g und unter Ausschaltung der Zentrifugenbremse entlang der Polymorphprep®-Lösungssäule aufgetrennt. Das langsame Auslaufen am Ende sollte eine eventuelle Vermischung verhindern. Die Erythrozyten wanderten zum Boden des Röhrcchens. Darüber befand sich ein Überstand, welcher von oben abwärts gesehen zunächst eine scharf abgegrenzte Bande Mononukleärer Zellen und danach eine diffuse Granulozyten Bande enthielt (Abbildung 12).

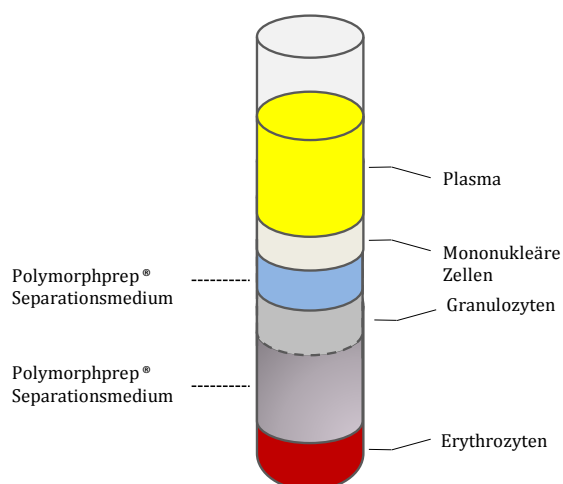


Abbildung 12: Aufteilung der Zellen entlang des Polymorphprep®-Gradienten

Als erstes wurde die Bande Mononukleärer Zellen mit einer Pipette abgesaugt und verworfen, danach konnte die Granulozyten-Bande in einem neuen 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt werden. Dazu kamen 5 ml Halbmedium. Der Rest bis zur 50 ml-Marke wurde mit RPMI-Lösung (mit Glutamin) erreicht. Die Röhrchen wurden nun für 10 min bei 319 g unter Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in 3 ml Lysepuffer aufgenommen, um restliche Erythrozyten zu entfernen. Nach ca. 30 Sekunden wurden die Röhrchen bis zur 50 ml Marke mit RPMI (mit Glutamin) aufgefüllt und wieder für 10 min bei 319 g unter Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 ml RPMI (mit Glutamin) resuspendiert und wieder für 10 min bei 319 g unter Raumtemperatur zentrifugiert. Als letzter Schritt wurde nach dem Verwerfen des Überstandes das Pellet nun in CL-Medium +1 %FCS aufgelöst. Die Menge an eingesetztem CL-Medium war bei den IVIG (ca. 6-8 ml) und bei den HSP90-Inhibitor (ca. 1,5 ml pro Pellet) Versuchen unterschiedlich. 10 µl der Zelllösung wurden unverdünnt und ungefärbt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Angestrebt wurden bei IVIG 200 Zellen pro Gesichtsfeld und bei dem HSP90-Inhibitor 400 Zellen pro Gesichtsfeld. Durch die definierte Vergrößerung am Mikroskop und die definierte Feldergröße ergab sich die Konzentration der Zellen aus dem Mittelwert an Zellen zweier Gesichtsfelder $\times 50$ (Verdünnungsfaktor) $\times 10^4$ Zellen/ml. Die erwünschte Ausgangs-Zellkonzentrationen betrug bei IVIG 2×10^6 Zellen/ml und bei 17-DMAG 4×10^6 Zellen/ml. War die Zellzahl zu niedrig, wurde erneut zentrifugiert und ein geringeres CL-Medium-Volumen benutzt. Die aufgereinigten Zelllösungen wurden auf Eis gelagert.

2.2.5 Herstellung der Pharmakonlösungen

IVIG

Die IVIG ROS-Freisetzung-Assays (RFA) enthielten die IVIG-Konzentrationen 10 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml. Da die Ausgangs-IVIG-Lösung in einer Konzentration von 50 g/100ml = 50 mg/ml vorlag, musste die IVIG-Lösung durch Zentrifugation in 15ml Centrikonröhrchen bei 4°C, 4000 rpm für 30-45 min zu einer Stockkonzentration von 100 mg/ml aufkonzentriert werden.

Alle Pharmakonlösungen sowie die Lösungen der Positiv- und Negativkontrolle und die FMLP-Lösung wurden mit CL-Medium und Zelllösung angesetzt und 2 Stunden vor

Kontakt mit dem Immunkomplex auf Eis inkubiert. Kurz vor dem Start der Chemolumineszenz-Reaktion wurde jeweils Luminol zugesetzt. Die Zellkonzentration in jedem Well lag bei ca. 1×10^6 Zellen/ml.

17-DMAG

Die eingesetzten 17-DMAG-Konzentrationen sind: 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$. Die Pharmakon-Lösungen wurden ebenfalls mit Zelllösung und CL-Medium hergestellt. Mindestens eine Stunde vor Kontakt mit dem Antigen-Antikörper-Komplex wurde die Zellsuspensionen mit dem Pharmakon auf Eis vorinkubiert. Pro Platte gab es 5 Messreihen mit Neutrophilen Granulozyten-Lösungen von 5 verschiedenen Spendern. Pro Well betrug die Zellkonzentration ca. 2×10^6 Zellen/ml. Kurz vor dem Start der Chemolumineszenz-Reaktion wurde Luminol zugesetzt.

2.2.6 Ansetzen von Luminol und FMLP

Luminol und FMLP wurden aufgrund des Spontanzerfalls immer kurz vor dem Start der Chemolumineszenz-Reaktion zubereitet, gekühlt und unter Lichtabschluss gehalten. Die Oxidierung von Luminol durch Sauerstoffradikale führt zur Chemolumineszenz von bläulichem Licht. Ziel war es eine Konzentration von 2 mg/ml Luminollösung herzustellen. Dazu musste Luminol zu erst in NAOH und dann in ddH₂O gelöst werden.

2.2.7 Starten der Reaktion und photometrische Messung

Die MicroWell-Platte wurde vom Schütteltisch genommen und die Wells im ELISA-Washer gespült. Währenddessen wurde das Photometer eingestellt und auf 37 °C Betriebstemperatur gebracht. Nach einer Spülung wurde die Wells manuell mit 200 μl CL-Medium gespült und die Platte ausgeklopft. Die MicroWell-Platte wurde auf Eis gelegt, um den Reaktionsstart zu verzögern. Abgesehen von den FMLP-Wells wurden 200 μl Zelllösung in jedes Well pipettiert.

In die Wells für FMLP wurden 100 μl Zellsuspension gegeben und mit 100 μl FMLP-Lösung aufgefüllt. Unmittelbar danach konnte die MicroWell-Platte in das Photometer

gelegt werden, welches mit der Messung begann. Dabei wurde jedes Well der Platte 60-mal photometrisch gemessen.

2.3 Gefrierschnitt-Assay

2.3.1 Grundprinzip des Gefrierschnitt-Assays

Der Gefrierschnitt-Assay (GA) ist ein *in vitro* Modell, welches, erstmals 1980 von Gammon et al. für BP beschrieben, die dermo-epidermale Spaltbildung abbildet. Dabei wurde Serum von BP-Patienten mit Gefrierschnitten aus normaler Haut inkubiert. In Folge wurden Leukozyten und Serum (welches Komplement enthält) von gesunden Spendern auf die Schnitte gegeben. Dies führt zur subepidermalen Spaltbildung im Bereich der DEJ, welches die Effektorphase der BP-Pathogenese wiedergibt [70].

Der GA wurde von Sitaru et al. für BP und EBA modifiziert. Die Autoren konnten zeigen, dass die Blasenbildung unabhängig von Komplement und mononukleären Zellen induziert werden kann. Ferner zeigte sich, dass Antikörper alleine oder $F(ab')_2$ -Fragmente der BP-180-Autoantikörper keine Spaltbildung auslösten [232, 234]. Vitale Neutrophile Granulozyten, welche reaktive Sauerstoffspezies und Enzymen freisetzen, sind zur Ausbildung der dermo-epidermalen Spaltbildung erforderlich [40, 224].

Im Prinzip binden die Autoantikörper ihr Ziel-Antigen (BP180 oder COL7) in der DEJ. Mit diesen Immunkomplexen inkubierte Neutrophile Granulozyten führen über Aktivierung zur Gewebeerstörung in der DEJ, was in einer Spaltbildung resultiert (Abbildung 13).

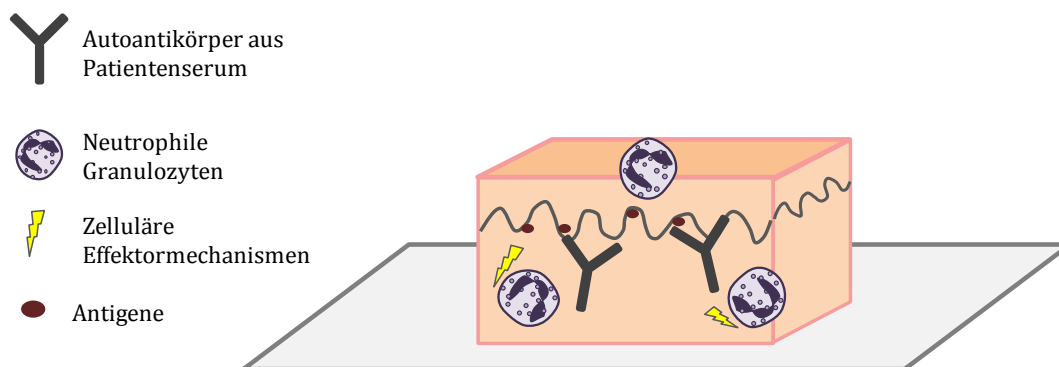


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Gefrierschnitt-Assays (modifiziert nach Gammon et al. 1980 [70]). Alle Elemente, bestehend aus den Gefrierschnitten mit Antigenen, den Autoantikörpern aus dem Patientenserum und den Neutrophilen Granulozyten, sind vorhanden.

2.3.2 Verwendete Autoantikörper von Patienten

Es wurden zwei unterschiedliche Pharmakonlösungen verwendet. Der GA mit dem HSP90-Inhibitor verwendete EBA-Patientenseren, der Versuch mit DMF BP-Patientenseren. Die Seren entstammen dem Autoimmunlabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität Lübeck. Um die geeignete Konzentration zur Induktion der dermo-epidermalen Spaltbildung für jedes individuelle Serum herauszufinden, wurden die Seren in Vorversuchen in unterschiedlichen Verdünnungen auf ihre Fähigkeit die dermo-epidermale Spaltbildung zu induzieren charakterisiert. Dabei wurden die Seren in der Regel mit PBS in den Verhältnissen 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 verdünnt. Gleichzeitig wurde bei maximaler Verdünnung (1:16) mehr verwendbare Autoantikörper-Lösung hergestellt.

Die Inkubation von pathogenen Seren, Haut und Leukozyten ohne die Beigabe von Pharmaka stellte die Positivkontrolle des Versuches da. Die Negativkontrolle bestand aus Kontrollserum ohne pathogene Wirkung, Haut und Neutrophilen Granulozyten.

2.3.3 Herstellen von Gefrierschnitten humaner Haut

Die humane Haut wurde in RPMI-Medium aufbewahrt und nach einem Waschvorgang in kaltem PBS geschnitten. Dabei wurde die Haut in ca. 5 x 15 mm große Stücke getrennt. In einzelnen Plastikschaalen wurden die Präparate mit Tissue-Tek®-O.C.T.-Compound-Medium eingebettet. In dieser Form konnte die Haut bei -80 °C aufbewahrt und bei Bedarf durch den Kryostaten (Leica CM 3000) in 6 µm dicke Schnitte geschnitten werden. Auf Super Frost Objektträgern wurden jeweils 2 humane Schnitte platziert. Die fertigen Objektträger lagerten bis zu ihrem Gebrauch bei -20 °C im Kühlfach.

2.3.4 Inkubation der Cryoschnitte mit Autoantikörper-Serum

Je nach eingesetztem Pharmakon bestand eine Versuchsreihe aus Positiv- und Negativkontrolle, eventuell einer weiteren Positivkontrolle mit dem Lösungsmittel des Pharmakons und drei unterschiedliche Dosierungen des Pharmakons.

Die Seren wurden entsprechend ihres besten Mischverhältnisses nach den Ergebnissen der Vorversuche verdünnt, sodass pro Hautpräparat ein 45 µl großer Tropfen zu Verfügung stand und es komplett bedeckte. Zwischen jeweils zwei Hautstücken wurde mit einem DAKO-Pen ein Fettstreifen gezogen, der eine Vermischung der unterschiedlichen Seren verhindern sollte. Die bedeckten Hautschnitte wurden in einer Feuchtkammer für 1 Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.3.5 Isolation und Vitalitätsprüfung humaner Neutrophiler Granulozyten

80 ml heparinisieretes Vollblut wurden nach Entnahme in vier 50 ml Falcon-Röhrchen zu 20 ml Dextran T500 (3 %)/NaCl (0,9 %) Lösung aufgeteilt. Durch Sedimentation entstand innerhalb einer halben Stunde unter Raumtemperatur eine Erythrozyten-reiche Schicht am Röhrchenboden und ein darüber liegender Leukozytenüberstand. Dieser wurde auf 3 neue 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt. Durch Zentrifugation für 12 min, bei 235 g und 19 °C entstanden 3 Pellet, welche in einem 50 ml Falcon-Röhrchen in 30 ml RPMI resuspendiert wurden. Die Lösung wurde erneut für 12 min, bei 235 g und bei 19 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 °C kalte 20 ml 0,2 % NaCl-Lösung für 30 sec resuspendiert. Danach wurden weitere 20 ml 4 °C kalter 1,6 % NaCl-Lösung hinzugegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 235 g für 12 min. Dieser Schritt diente der Zerstörung der restlichen verbliebenen Erythrozyten durch Veränderung ihrer Osmolarität. Der Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit 20 ml RPMI resuspendiert, für 7 min bei 235g bei 4 °C zentrifugiert und schließlich mit etwa 10-14 ml RPMI resuspendiert. Das Volumen an RPMI war abhängig von der verwendeten Objektträgeranzahl, welche ein Mindestvolumen an Zellsuspension definierte (pro Objektträger ca. 450-500 µl Zellsuspension).

Die Zellkonzentration und die Vitalität der Zellen wurden in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Mit Trypan-Blau, welches zu Blaufärbung des Zytosols von abgestorbenen Zellen führt, erfolgte die Vitalitätsprüfung. 10 µl Zellsuspension wurde 1:50 mit 440 µl PBS und 50 µl Trypan Blau verdünnt. In der Zählkammer wurden jeweils 2 große Felder mit je 16 Einzelfeldern gezählt und der Mittelwert gebildet. Durch die definierte Vergröße-

nung am Mikroskop und die definierte Feldergröße ergab sich die Konzentration der Zellen aus dem Mittelwert an Zellen zweier Gesichtsfelder $\times 50$ (Verdünnungsfaktor) $\times 10^4$ Zellen/ml. Angestrebt wurde eine Vitalität von $> 90\%$ und eine Zellzahl von 5 bis 10×10^7 Zellen/ml. War die Zellzahl erreicht wurde die Zelllösung zur Herstellung der einzelnen Pharmakonlösungen und Positiv- bzw. Negativkontrollen verwendet. Die fertigen Pharmakonlösungen kamen bis auf die Lösung von 17-DMAG sofort nach ihrer Fertigstellung auf die Objektträger. Bei 17-DMAG wurden die Leukozyten für eine Stunde mit dem Pharmakon vorinkubiert, bevor sie mit den Antigen-Antikörper Immunkomplexen in Kontakt kamen.

2.3.6 Anfertigung der Pharmakonlösung mit humanen Neutrophilen Granulozyten

Dimethylfumarat (DMF)

DMF wurde in den Endkonzentrationen $5 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ und $15 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Da DMF schlechte Lösungseigenschaften besitzt, wurde der Wirkstoff zur Herstellung der Stocklösung in Alkohol (100 %, vergällt) gelöst. Zum Ausschluss eines Effektes von Alkohol als Lösungsmittel auf die dermo-epidermale Spaltbildung wurde daher bei jeder Versuchsreihe eine zusätzliche Positivkontrolle verwendet: Positivkontrolle-Ethanol (PK-EtOH) mit der maximal eingesetzten Alkoholkonzentration. Die PK-EtOH durchlief die gleiche Verdünnungsreihe wie die $15 \mu\text{g/ml}$ DMF-Lösung und wurde 1:666 fach verdünnt. Die normale Positivkontrolle wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen hergestellt, um sowohl die Zellanteile von $5 \mu\text{g/ml}$ und $15 \mu\text{g/ml}$ widerzuspiegeln: $950 \mu\text{l}$ Zelllösung und $50 \mu\text{l}$ RPMI oder $850 \mu\text{l}$ Zelllösung und $150 \mu\text{l}$ RPMI. Die Negativkontrolle wurde mit $950 \mu\text{l}$ Zelllösung und $50 \mu\text{l}$ RPMI angefertigt.

17-DMAG (HSP90-Inhibitor)

17-DMAG wurde in den Endkonzentrationen $10 \mu\text{mol/l}$, $100 \mu\text{mol/l}$ und $250 \mu\text{mol/l}$ jeweils mit einem Volumen an Zelllösung von $400 \mu\text{l}$ angesetzt. Die Positiv- und Negativkontrolle wurden aus $500 \mu\text{l}$ Zellen und $100 \mu\text{l}$ RPMI angefertigt.

2.3.7 Inkubation der Gefrierschnitte mit den Zellsuspensionen und Medikamenten

Nach der Inkubation mit Serum wurden die Objektträger aus dem Brutschrank geholt und in PBS gewaschen. Danach wurde jeweils ein weiterer unbeschichteter Objektträger, mit definierten Abstandshaltern an den Seiten, durch Parafilmstreifen an die Objektträger mit den Hautpräparaten befestigt, so dass ein 1-2 mm hohe Kammer mit einem Volumen von ca. 450-500 μl entstand (Abbildung 14).

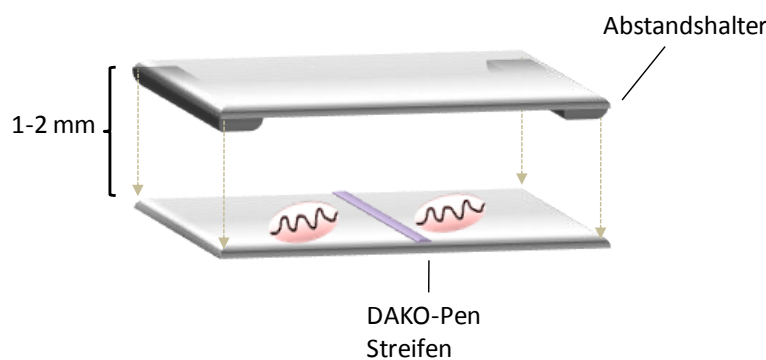


Abbildung 14: Reaktionskammer beim Gefrierschnitt-Assay (nach Gammon et al. 1980 [70]). Die Reaktionskammer bildet sich zwischen den beiden Objektträgern aus und hat bei einer Spaltenbreite von 1-2 mm ein Volumen von ca. 450-500 μl .

Mit einer Pipette wurde dieses Volumen vorsichtig in den Spalt gegeben. Wichtig war eine langsame Applikation, um Blasen zu verhindern. Die fertigen Reaktionskammern wurden in einer abgedunkelten Feuchtkammer für 3 Stunden in den Brutschrank bei 37 °C gestellt.

2.3.8 Färben und mikroskopische Auswertung

Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger unter mikroskopischer Kontrolle, bis nur wenige Granulozyten im Bereich der DEJ vorhanden waren, in einem PBS-Bad gewaschen. Dieser Vorgang ist wichtig, da sonst die nicht entfernten, gefärbten Zellen eine eventuelle Spaltbildung überdecken und so die Auswertung erschweren würden. Anschließend wurden die Objektträger nach Formaldehydfixierung H&E gefärbt (Hämatoxylin & Eosin) und durch den Glaseindeckautomat der Firma Leica (Leica CV 5030) mit einem Deckgläschen versehen.

2.4 Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Der Grad der ROS-Freisetzung wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion bestimmt. Jedes Well der MicroWell-Platte wurde dabei insgesamt 60-mal photometrisch gemessen. Die gewonnenen 60 „Counts per second“ (CPS) wurden zur Gesamt-AUC des Wells addiert. Pro Versuchsreihe besitzt ein Versuchselement (Positivkontrolle, Negativkontrolle, FMLP, Wirkstoff-Lösungen) 2 Wells. Aus der Gesamt-AUC beider Wells wurde der Mittelwert für das Versuchselement gebildet.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Gefrierschnitt-Assay-Objektivträger wurde die dermo-epidermalen Spaltbildung in der DEJ zur Gesamtlänge der DEJ pro Hautstück verglichen. War die komplette Epidermis von der Dermis getrennt, wurde die dermo-epidermale Separation mit 100 % festgelegt. Hautstücke ohne Spaltbildung erhielten den Wert 0 %. In allen anderen Fällen, bei denen weder das eine noch das andere gegeben war, musste die prozentuale dermo-epidermale Separation geschätzt werden.

Die Schätzung der dermo-epidermalen Spaltbildung fand verblindet durch Herrn Prof. Dr. med. Ludwig statt.

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Sigma-Plot 11.0 und Microsoft-Excel. Es wurden der Kruskal-Wallis-Test, Student-Newman-Keuls-Test und der Mann-Whitney-Test verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Boxplotdiagrammen. Für die Gewinnung von Bildern der mikroskopischen Präparate wurden die Software ProgResCapture 2.1 verwendet.

3 Ergebnisse

Die Therapie von BP und EBA geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher, sodass nach nebenwirkungsarmen Medikamenten gesucht wird [33, 110]. Bei beiden Erkrankungen sind Granulozyten an der Pathophysiologie beteiligt [121, 148, 150, 229]. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, den Effekt von bereits in der Therapie von Autoimmunerkrankungen etablierten Wirkstoffen mit unklarem Wirkmechanismus und potentiellen neuen immunsuppressiven Medikamenten auf die Funktion von Neutrophilen Granulozyten zu untersuchen. Als Wirkstoffe wurden hierfür IVIG, DMF und der HSP90-Inhibitor 17-DMAG in den zwei etablierten *in vitro* Versuchsmodellen Gefrierschnitt-Assay (GA) und ROS-Freisetzung-Assay (RFA) eingesetzt. In der Arbeitsgruppe wurden bereits ein Gefrierschnitt-Assay mit IVIG [95] und ein ROS-Freisetzung-Assay mit DMF [181] durchgeführt. An beiden Versuchen bestand Mitarbeit und dadurch ein gleichzeitiges Erlernen des Versuchsablaufs. Für den HSP90-Inhibitor 17-DMAG wurden sowohl der GA als auch der RFA selbständig durchgeführt (Abbildung 24).

3.1 Intravenöse Immunglobuline reduzieren die Freisetzung von radikalen Sauerstoffspezies im ROS-Freisetzung-Assay

Die klinische Wirksamkeit der nebenwirkungsarmen intravenösen Immunglobuline ist akzeptiert und die Anwendung bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen unter anderem auch beim bullösen Pemphigoid nach der Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft indiziert [60, 170]. Für IVIG wurden *in vivo* und *in vitro* verschiedene Effekte beschrieben sodass weiterhin Unklarheit über den Wirkmechanismus besteht. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits im Gefrierschnitt-Assay mit BP-Immunkomplexen ein antiinflammatorischer Effekt von IVIG nachgewiesen. Im ROS-Freisetzung-Assay sollen diese Ergebnisse bestätigt und durch photometrische Messungen genauer dargestellt werden. Es wurden in 25 Versuchen die Effekte von 10 mg/ml, 20 mg/ml und 40 mg/ml IVIG auf die BP-Immunkomplex-vermittelte ROS-Freisetzung aus Neutrophilen Granulozyten gemessen.

Ein Versuch bestand aus den Elementen Positivkontrolle (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten), Negativkontrolle (nicht-aktivierte Neutrophile Granulozyten ohne Immunkomplexe), FMLP (FLMP-aktivierte Neutrophile Granulozyten) und den drei IVIG-Konzentrationen (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und IVIG).

FMLP als potentester Auslöser einer ROS-Freisetzung von Neutrophilen Granulozyten diente als Vergleich für die Positivkontrolle. Nach dem Kontakt von Immunkomplexen oder FMLP mit Neutrophilen Granulozyten kam es sofort zur Produktion von ROS, welches durch die Fluoreszenzreaktion mit Luminol photometrisch gemessen werden konnte (Einheit *Counts per Second*; CPS). Dabei zeigt sich bei 60 Messungen ein rasches Erreichen eines Maximums an ROS gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall der ROS. Exemplarisch dafür wurden in der Abbildung 15 die typischen Kurvenverläufe eines Versuchs dargestellt. Es zeigt sich die maximale ROS-Freisetzung bei FMLP, die im Vergleich dazu moderate ROS-Produktion bei der Positivkontrolle und eine vernachlässigbar geringe ROS-Freisetzung bei der Negativkontrolle.

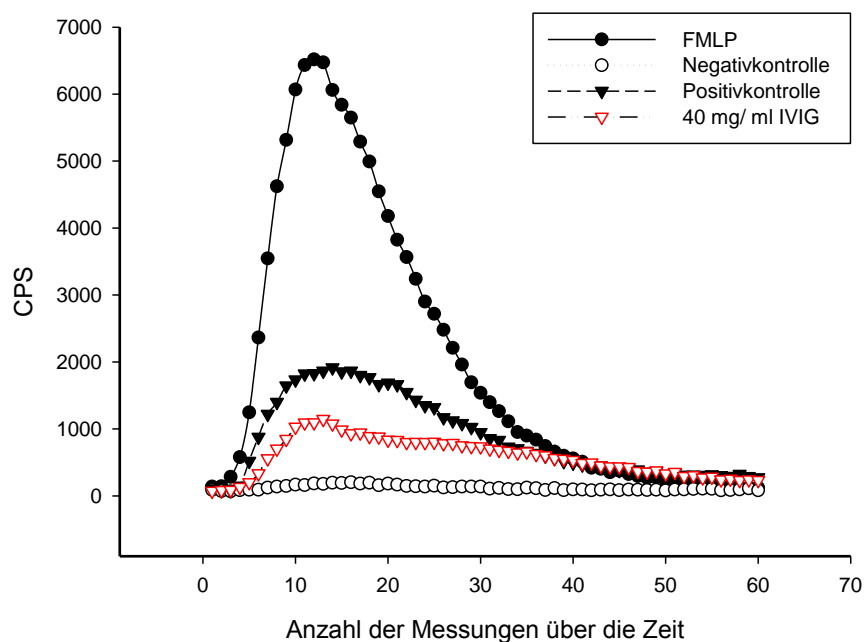


Abbildung 15: ROS Freisetzung über die Zeit. Für FMLP (FLMP-aktivierte Neutrophile Granulozyten), Positivkontrolle (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten) und 40 mg/ml IVIG (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und IVIG) zeigt sich bei photometrischer Messung ein rasches Erreichen des Maximums mit anschließendem langsamen Kurvenabfall bis auf das Negativkontrollen (nicht-aktivierte Neutrophile Granulozyten ohne Immunkomplexe) Niveau. Die Fläche unter jeder Kurve ist die *Area under the Curve* (AUC). Gezeigt sind die Ergebnisse eines Experimentes

Die Fläche unter der jeweiligen Kurve ist die *Area under the Curve* (AUC). Sie ergibt sich als Summe aus den über die Zeit gemessenen 60 ROS-Messungen eines Versuchs. Damit lagen bei 25 durchgeführten Versuchen 25 vergleichbare AUCs vor, die statistisch aufgearbeitet werden konnten.

Insgesamt ergab sich ein Median der AUC bei FMLP von 72.232 CPS (25 %-Perzentile: 21.367 CPS, 75 %-Perzentile: 135.091 CPS), bei der Positivkontrolle von 61.470 CPS (25 %-P: 39.071 CPS, 75 %-P: 92.349 CPS) und bei der Negativkontrolle von 8.995 CPS (25 %-P: 7.032 CPS, 75 %-P: 24.074 CPS).

Dabei stellt die Positivkontrolle die maximal durch Autoantikörper verursachte ROS-Freisetzung dar. Mit ihr wurde die ROS-Produktion der drei verschiedenen IVIG-Konzentrationen verglichen (Abbildung 16).

Es ergibt sich eine Median der AUC für die 10 mg/ml IVIG-Konzentrationen von 69.873 CPS (25 %-P: 41.131 CPS, 75 %-P: 83.675 CPS), für die 20 mg/ml Konzentration von 54.369 CPS (25 %-P: 33.708 CPS, 75 %-P: 75.507 CPS) und für die 40 mg/ml Konzentration von 26.973 CPS (25 %-P: 22.308 CPS, 75 %-P: 34.019 CPS).

Die Mediane von Positivkontrolle und den drei IVIG Konzentrationen sind untereinander signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,001$). Zum Vergleich der Ergebnisse der IVIG-Konzentrationen mit den Werten der Positivkontrolle wurde der Student-Newman-Keuls-Test verwendet. Nur bei der 40 mg/ml IVIG-Konzentration liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p < 0,05$). Die 10 mg/ml und die 20 mg/ml IVIG-Konzentration führten im Vergleich zur Positivkontrolle zu keiner statistisch signifikanten Hemmung der ROS-Freisetzung ($p > 0,05$). Die eingesetzte 40 mg/ml IVIG-Konzentration konnte die ROS-Freisetzung durch BP-Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten erfolgreich hemmen (Abbildung 16).

Positivkontrolle vs IVIG

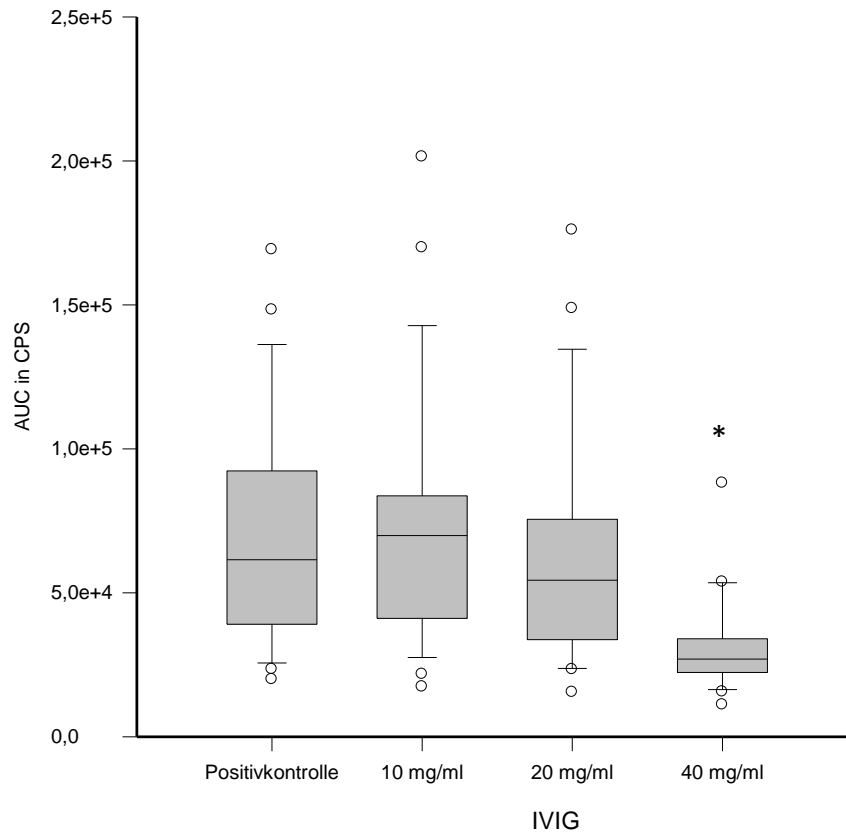


Abbildung 16: Positivkontrolle vs IVIG. In $n = 25$ Versuchen wurde die ROS-Freisetzung im ROS-Freisetzung-Assay ohne Einfluss von IVIG (Positivkontrolle: Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten) und mit verschiedenen IVIG-Konzentrationen (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und IVIG) im Box-Plot-Diagramm dargestellt. Der Median (zentrale schwarze Linie), der 25 %-Perzentilen-Bereich (unterer Rand der Box), der 75 %-Perzentilen-Bereich (oberer Rand der Box), die 5 % und 95 % Fehlerbalken (untere und obere Antenne) und die Ausreißer (Punkte) sind dargestellt. Eine signifikante Hemmung der ROS-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle wird mit * angezeigt. Dies ist bei der 40 mg/ml IVIG Konzentrationen gegeben (Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).

3.2 Hemmung der dermo-epidermalen Spaltbildung durch Dimethylfumarat

DMF wird seit Jahrzehnten für die orale Behandlung der Psoriasis eingesetzt [178, 181]. Aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung und dem günstigen Nebenwirkungsprofil, bot sich der Einsatz bei anderen chronischen inflammatorischen Erkrankungen, wie z. B. Multiple Sklerose, an [94, 199]. Fumarsäure-Derivaten wurden mehrere Wirkmechanismen

in unterschiedlichen Zellarten zugesprochen [167]. Der Effekt auf Neutrophile Granulozyten wurde bisher kaum untersucht. Deshalb wurde hier ein Gefrierschnitt-Assay mit BP Immunkomplexen und den DMF Lösungen: 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml DMF durchgeführt.

Für den *in vitro* Test liegen insgesamt 10 Versuche aus jeweils Positivkontrolle (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten), Positivkontrolle-Ethanol (PK-EtOH, Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und Lösungsmittel Ethanol), Negativkontrolle (nicht-aktivierte Neutrophile Granulozyten, keine Immunkomplexe) und drei DMF Konzentrationen (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten, Lösungsmittel-Ethanol und DMF) vor.

Da der Wirkstoff DMF in Ethanol in Lösung gebracht wurde, musste zusätzlich die PK-EtOH mit der maximal verwendeten Lösungsmittelkonzentration an Ethanol eingeführt werden. Der Median für die dermo-epidermale Spaltbildung der Positivkontrolle liegt bei 23 % (25 %-Perzentile: 5 %, 75 %-Perzentile: 68 %) und der Median der PK-EtOH bei 30 % (25 %-P: 20 %, 75 %-P: 80 %). Nach dem Mann-Whitney-Test besteht zwischen der Positivkontrolle und PK-EtOH kein signifikanter Unterschied bei einem $p = 0,402$ (Abbildung 17). Damit ist ein Effekt des Lösungsmittels auf die Spaltbildung ausgeschlossen. Die Negativkontrolle besitzt wie erwartet keine sichtbare Ablösung in der DEJ (Median 0 %, 25 %-P: 0 % und 75 %-P: 1 %) (Abbildung 17).

Positivkontrolle vs PK-EtOH vs Negativkontrolle

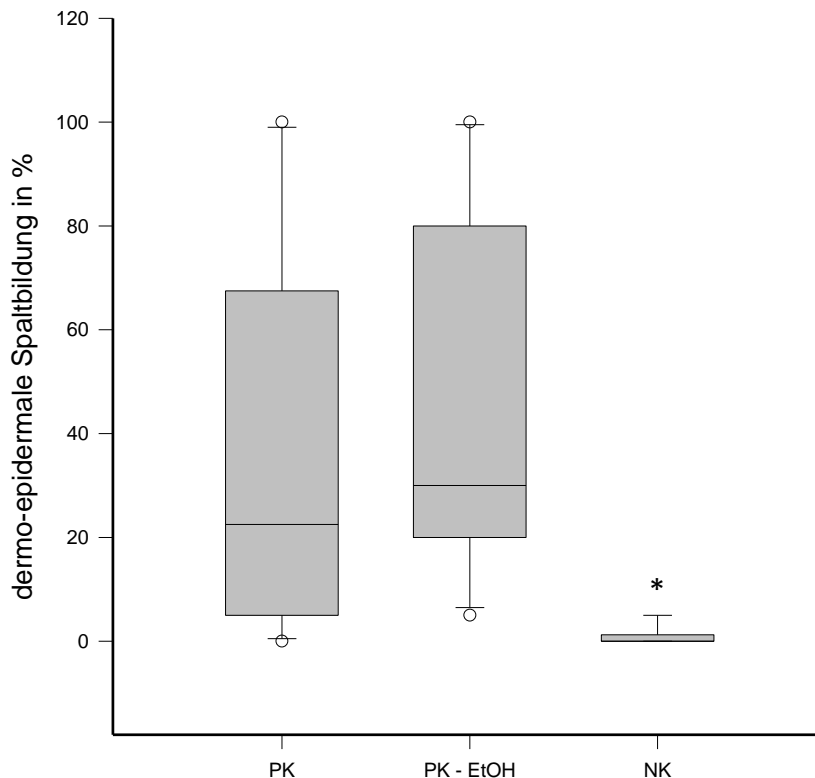


Abbildung 17: Positivkontrolle vs PK-EtOH vs Negativkontrolle. Bei $n = 10$ Versuchen wurde die dermo-epidermale Spaltbildung der Positivkontrolle (Median 23 %), der PK-EtOH (Median 30 %) und der Negativkontrolle (Median 0 %) verglichen und im Box-Plot-Diagramm dargestellt. Zu erkennen sind der Median (zentrale schwarze Linie), der 25 %-Perzentilen-Bereich (unterer Rand der Box), der 75 %-Perzentilen-Bereich (oberer Rand der Box), die 5 % und 95 % Fehlerbalken (untere und obere Antenne) und die Ausreißer (Punkte). Ein signifikanter Unterschied (**Mann-Whitney-Test**, $p < 0,05$) wird mit * angegeben und liegt zwischen den Ergebnissen jeder Positivkontrolle und der Negativkontrolle vor.

Die eingesetzten DMF-Konzentrationen erreichten eine Reduzierung der prozentualen dermo-epidermalen Spaltbildung. Für 5 $\mu\text{g/ml}$ DMF lag der Median der dermo-epidermalen Spaltbildung bei 13 % (25 %-P: 2 %, 75 %-P: 48 %), für 10 $\mu\text{g/ml}$ DMF bei 13 % (25 %-P: 5 %, 75 %-P: 56 %) und für die maximal eingesetzte DMF-Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ bei 5 % (25 %-P: 0 %, 75 %-P: 45 %). Ein Vergleich der Ergebnisse der drei DMF-Konzentration gegenüber der PK-EtOH wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Bei allen eingesetzten DMF-Konzentrationen konnte eine statistisch signifikante Reduzierung der BP-Autoantikörper-

induzierten, dermo-epidermalen Spaltbildung nachgewiesen werden ($p < 0,05$) (Abbildung 18, Abbildung 19).

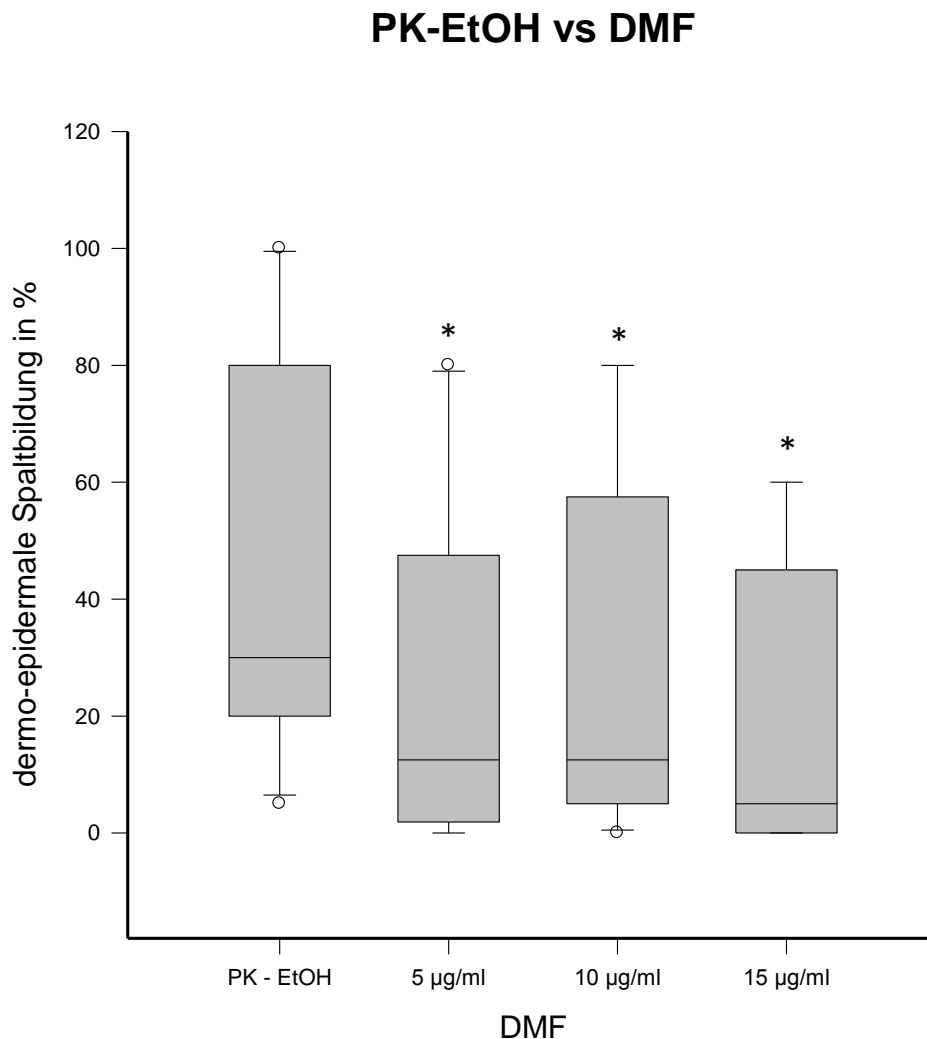


Abbildung 18: PK-EtOH vs DMF: Vergleich der Neutrophilen Granulozyten abhängigen, BP Immunkomplex induzierten dermo-epidermalen Spaltbildung bei PK-EtOH (Median 30 %), der 5 µg/ml (Median 13 %), 10 µg/ml (Median 13 %) und 15 µg/ml (Median 5 %) DMF Konzentration im Gefrierschnitt-Assay. Bei $n = 10$ Versuchen erfolgt die Darstellung der Ergebnisse im Box-Plot-Diagramm. Zu erkennen ist der Median (zentrale schwarze Linie), der 25 %-Perzentilen-Bereich (unterer Rand der Box), der 75 %-Perzentilen-Bereich (oberer Rand der Box), die 5 % und 95 % Fehlerbalken (untere und obere Antenne) und die Ausreißer (Punkte). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) wird mit * angegeben und liegt zwischen allen drei DMF-Konzentrationen und PK-EtOH vor (Kruskal-Wallis-Test und Student-Newman-Keuls-Test).

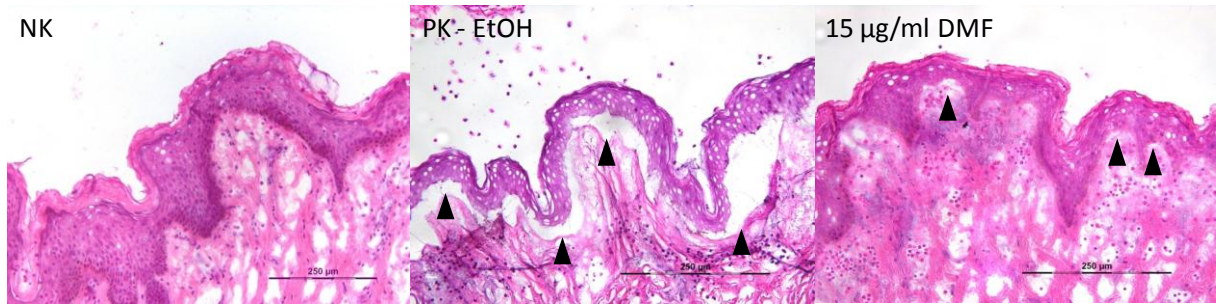


Abbildung 19: Hemmung der Spaltbildung durch 15 µg/ml DMF modifiziert nach Müller et al. 2015 [181]. Mikroskopische Bilder der HE-gefärbten Gefrierschnitte. Das ▲ markiert die dermo-epidermale Spaltbildung. Keine Spaltbildung bei der Negativkontrolle (NK), maximale Spaltbildung bei der PK-EtOH und deutliche Reduktion mit vereinzelter Spaltbildung bei 15 µg/ml DMF

3.3 HSP90-Inhibitor 17-DMAG verhindert vollständig die dermo-epidermale Spaltbildung und reduziert potent die ROS-Freisetzung

Eine HSP90-Inhibition führte in den Tiermodellen der Autoimmun-Enzephalitis, der rheumatoiden Arthritis und des systemischen Lupus erythematoses zu einem immunsuppressiven Effekt [114]. Auch ein Einsatz von HSP90-Inhibitoren bei der experimentellen EBA führte zur Krankheitsremission. Es wird vermutet, dass HSP90 ähnlich wie beim BP [253-254] eine Rolle bei der Pathophysiologie von EBA spielt [114, 250]. Um den Effekt von HSP90-Inhibitoren auch im *in vitro* EBA-Modell zu bestätigen und gleichzeitig die kaum in der Literatur beschriebenen Effekte von HSP90-Inhibitoren auf aktivierte Neutrophile Granulozyten [30] nachzuweisen wurden der GA und RFA mit dem HSP90-Inhibitor 17-DMAG durchgeführt.

Beim GA wurden EBA-Patientenseren zur Bildung der Immunkomplexe in 10 Versuchen, bestehend aus jeweils Positivkontrolle (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten), Negativkontrolle (nicht-aktivierte Neutrophile Granulozyten, keine Immunkomplexe) und drei 17-DMAG Konzentrationen (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und 17-DMAG) Konzentrationen verwendet.

Der Median für die prozentuale dermo-epidermale Spaltbildung der Positivkontrolle lag bei 23 % (25 %-Perzentile: 13 %, 75 %- Perzentile: 31 %). Bei den Negativkontrolle waren wie erwartet keine Anzeichen einer Spaltbildung bei vollständig intakter DEJ auszumachen; der Median lag bei 0 % (25 %-P: 0 %, 75 %-P: 0 %). Zwischen dem Median der Positivkontrolle und Negativkontrolle bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; Mann-Whitney-Test). Somit wurde EBA erfolgreich im *in vitro* Assay simuliert.

Eine 17-DMAG Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ erreichte ebenfalls wie die Positivkontrolle einen Median von 23 % (25 %-P: 13 %, 75 %-P: 45 %) für die dermo-epidermale Spaltbildung. Eine 10-fach höhere 17-DMAG Konzentration mit 100 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG führte hingegen ungefähr zu einer Halbierung der Spaltbildung auf 10 % (25 %-P: 4 %, 75 %-P: 30 %). Die maximal eingesetzte Dosis von 250 $\mu\text{mol/l}$ konnte die komplette dermo-epidermale Spaltbildung unterdrücken. Wie bei der Negativkontrolle lag der Median bei 0 % (25 %-P: 0 %, 75 %-P: 0 %) (Abbildung 20, Abbildung 21).

Zwischen den Medianen aller Versuchsgruppen bestand im Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Ein Vergleich der Ergebnisse der Pharmakonlösungen mit den Werten der Positivkontrolle zeigte im Student-Newman-Keuls-Test nur bei 250 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG-Konzentration einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Die 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG-Konzentration erreichten keinen signifikanten Effekt ($p > 0,05$).

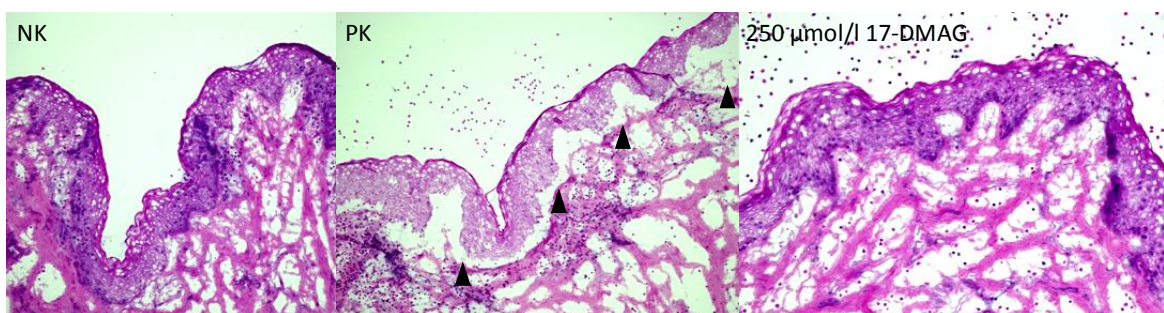


Abbildung 20: Hemmung der Spaltbildung durch 250 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG. Mikroskopische Bilder der HE gefärbten Gefrierschnitte. Das \blacktriangle markiert die dermo-epidermale Spaltbildung. Keine Spaltbildung bei der Negativkontrolle (NK), maximale Spaltbildung bei der Positivkontrolle (PK) und deutliche Reduktion mit fehlendem Nachweis von Spaltbildung bei 250 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG.

Positivkontrolle vs 17- DMAG

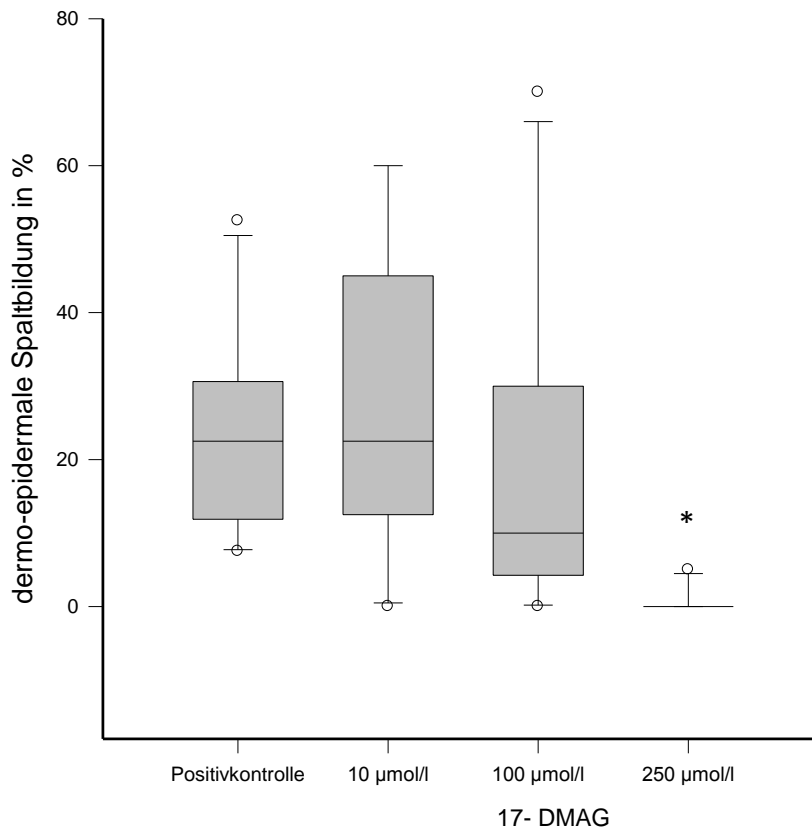


Abbildung 21: Positivkontrolle vs 17-DMAG. Aus 10 Versuchsreihen wurde die dermo-epidermale Spaltbildung im Gefrierschnitt-Assay ohne Einfluss von 17-DMAG (Positivkontrolle) und mit verschiedenen 17-DMAG-Konzentrationen im Box-Plot-Diagramm dargestellt. Der Median (zentrale schwarze Linie), der 25 %-Perzentilen-Bereich (unterer Rand der Box), der 75 %-Perzentilen-Bereich (oberer Rand der Box), die 5 % und 95 % Fehlerbalken (untere und obere Antenne) und die Ausreißer (Punkte) sind dargestellt. Eine signifikante Hemmung der dermo-epidermalen Spaltbildung im Vergleich zur Positivkontrolle wird mit * angezeigt. Dies liegt hier nur bei der 250 µmol/l 17-DMAG Konzentrationen vor (Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).

Um die Ergebnisse aus dem GA zu bestätigen und den Effekt der 100 µmol/l 17-DMAG Konzentration exakter durch photometrische Messungen zu bestimmen, wurde zusätzlich der ROS-Freisetzungs-Assay durchgeführt.

Für den RFA mit 17-DMAG liegen 15 Versuche, aus Positivkontrolle (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten), Negativkontrolle (nicht-aktivierte Neutrophile Granulozyten ohne Immunkomplexe), FMLP (FLMP-aktivierte Neutrophile Granulozyten) und den drei 17-DMAG Konzentrationen (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und 17-DMAG) vor. Es wurden ebenfalls EBA-Immunkomplexe verwendet. Eine

FMLP-Stimulation von Neutrophilen Granulozyten wurde als potentester Auslöser einer ROS-Freisetzung, als weitere Form der Positivkontrolle in die Versuchsreihen integriert. Analog dem RFA bei IVIG wurde der typische Kurvenverlauf der ROS-Freisetzung für jedes Versuchselement durch 60 photometrische Messungen bestimmt (Abbildung 22). Zur statistischen Auswertung diente wieder die *Area under the Curve* (AUC).

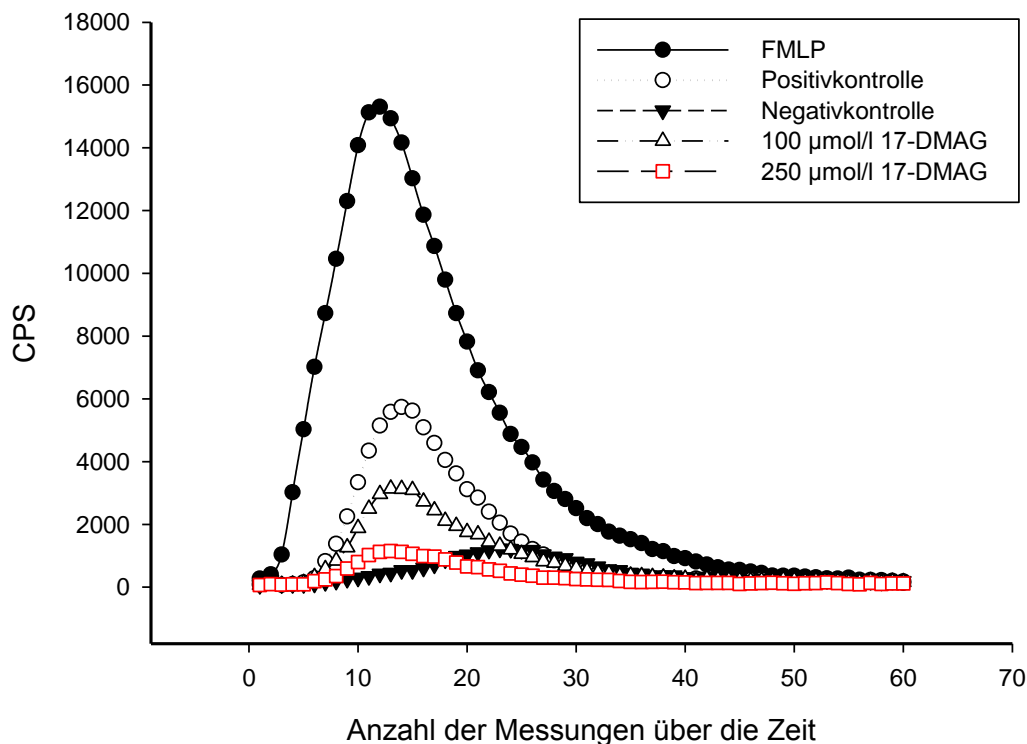


Abbildung 22: ROS Freisetzung über die Zeit. Für FMLP (FLMP-aktivierte Neutrophile Granulozyten), Positivkontrolle (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten), 100 µmol/l 17-DMAG und 250 µmol/l 17-DMAG (Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten und 17-DMAG) zeigt sich bei photometrischer Messung ein rasches Erreichen des Maximums mit anschließendem langsamen Kurvenabfall bis auf das Negativkontrollen (nicht-aktivierte Neutrophile Granulozyten ohne Immunkomplexe) Niveau. Die Fläche unter jeder Kurve ist die *Area under the Curve* (AUC).

Bei 15 Versuchsreihen lautete der Median der AUC bei FMLP und Positivkontrolle 158.267 CPS (25 %-Perzentile: 73.526 CPS, 75 %-Perzentile: 213.398 CPS) und 68.752 CPS (25 %-P: 51.981 CPS, 75 %-P: 92.098 CPS). Die gemessene AUC von FMLP beträgt damit mindestens das Doppelte der Positivkontrolle. Bei der Negativkontrolle wurde eine

Median für die AUC von 19.166 CPS (25 %-P: 12.737 CPS, 75 %-P: 25.871 CPS) gemessen. Zwischen den Medianen jedes Versuchselements bestand nach dem Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Zwischen den Signalen von Positivkontrolle und Negativkontrolle sowie FLMP und Negativkontrolle bestand ein signifikanter Unterschied (Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$). Eine Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten mit Freisetzung von ROS konnte nachgewiesen werden. Die AUC der Positivkontrolle zeigt dabei wiederum die maximal durch Autoantikörper verursachte ROS-Freisetzung.

Für 10 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG ergab sich ein Median der AUC von 68.585 CPS (25 %-P: 54.631 CPS, 75 %-P: 108.982 CPS), bei 100 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG beträgt der Median der AUC 46.676 CPS (25 %-P: 36.289 CPS, 75 %-P: 52.291 CPS). Die stärkste Hemmung der ROS-Freisetzung ist durch 250 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG mit einem Median von 19.456 CPS (25 %-P: 15.818 CPS, 75 %-P: 21.428 CPS) zu messen. Die Ergebnisse entsprechen etwa dem Level des AUC Medians der Negativkontrolle (19.166 CPS). Dabei konnte ein zytotoxischer Effekt auf Neutrophile Granulozyten bereits in einer anderen Arbeit ausgeschlossen werden [252].

Alle Mediane sind nach dem Kruskal-Wallis-Test signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Im Vergleich mit den Daten der Positivkontrolle konnten im Student-Newman-Keuls-Test sowohl die 100 $\mu\text{mol/l}$ als auch die 250 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG-Konzentration eine signifikante Reduktion der ROS-Produktion verursachen ($p < 0,05$) (Abbildung 23). Der hemmende Effekt der 100 $\mu\text{mol/l}$ Dosis wurde im GA bereits vermutet, ließ sich dort aber nicht statistisch nachweisen. Die 10 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG-Konzentration führte zur keinem signifikanten Effekt (Student-Newman-Keuls-Test, $p > 0,05$). Ein Dosis-Wirkung-Effekt ist statistisch signifikant zwischen der AUC von 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ sowie zwischen der AUC von 100 $\mu\text{mol/l}$ und 250 $\mu\text{mol/l}$ zu beobachten. ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test) (. Der HSP90-Inhibitor konnte auch im ROS-Freisetzung-Assay effektiv die Aktivität von Neutrophilen Granulozyten hemmen.

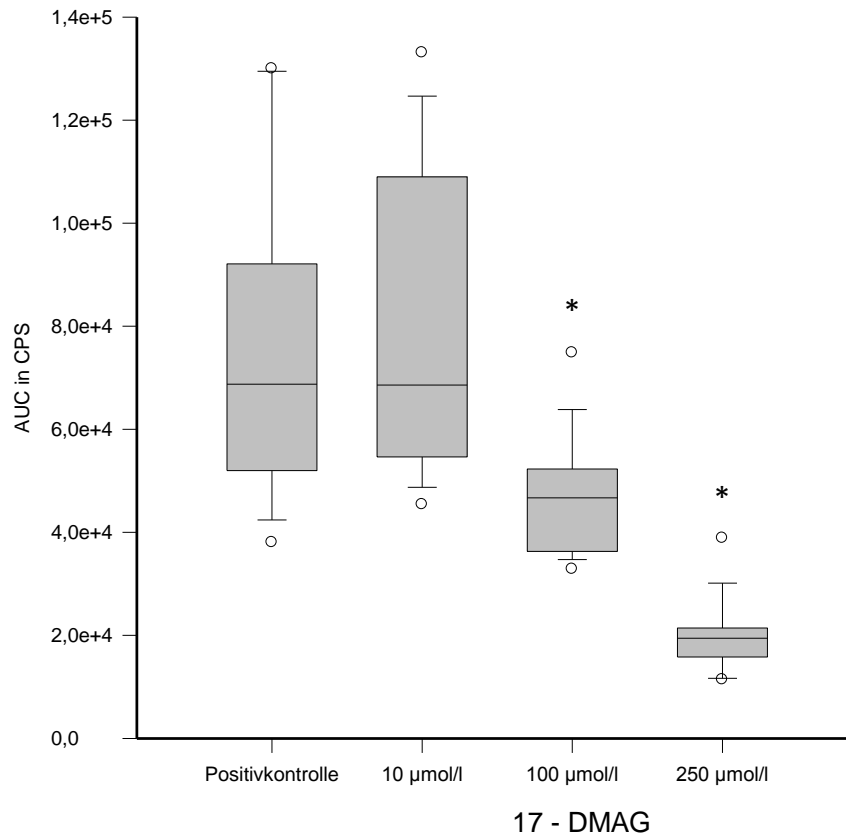
Positivkontrolle vs 17 - DMAG

Abbildung 23: Positivkontrolle vs 17-DMAG. Aus 15 Versuchsreihen wurde die ROS-Freisetzung im ROS-Freisetzung-Assay ohne Einfluss von 17-DMAG (Positivkontrolle) und mit verschiedenen 17-DMAG-Konzentrationen im Box-Plot-Diagramm dargestellt. Der Median (zentrale schwarze Linie), der 25 %-Perzentilen-Bereich (unterer Rand der Box), der 75 %-Perzentilen-Bereich (oberer Rand der Box), die 5 % und 95 % Fehlerbalken (untere und obere Antenne) und die Ausreißer (Punkte) sind dargestellt. Eine signifikante Hemmung der ROS-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle wird mit * angezeigt. Dies ist bei der 100 µmol/l und 250 µmol/l 17-DMAG-Konzentrationen gegeben (Student-Newman-Keuls-Test, $p < 0,05$).

4 Diskussion

Durch die beiden verwendeten *in vitro* Versuche wird nur ein Bruchteil der Pathophysiologie von BP und EBA simuliert. Diese Vereinfachung der *in vivo* Situation bringt Vorteile für die Auswertung der Ergebnisse. Ein *in vitro* Modell mit limitierten Versuchsbedingungen ermöglicht von vornherein mögliche Wirkmechanismen auszuschließen, weil zum Beispiel Elemente der Pathophysiologie nicht vorhanden sind oder langwierige *in vivo* Vorgänge durch nur kurze *in vitro* Versuchszeiten unwahrscheinlich werden.

4.1 Intravenöse Immunglobuline und ihre Wirkung im *in vitro* ROS-Freisetzungs-Assay

Von allen drei in dieser Arbeit getesteten Substanzen hat einzig allein IVIG einen nicht-synthetischen Ursprung. Es ist das Produkt aus dem gepooltem Plasma von 10.000 bis 20.000 gesunden humanen Spendern. Insgesamt gilt IVIG als gut verträglich und nebenwirkungsarm. [46, 62, 170, 214]. Einen antiinflammatorischen und cortisonsparenden Effekt von IVIG konnte bereits in mehreren klinischen Studien bei der Therapie von BP- und EBA-Patienten nachgewiesen werden [1, 62, 79-80, 85, 137]. Nach der aktuell gültigen AWMF S2k Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Pemphigus vulgaris und des bullösen Pemphigoids“ kommt IVIG als therapeutische Option bei ausbleibender Remission zum Einsatz [60].

Durch die aufwändige Herstellung entstehen im Vergleich zu anderen immunsuppressiven Medikamenten deutlich höhere Präparatkosten [107]. Insgesamt müssen aber die zusätzlichen Kosten für die Nebenwirkungstherapie von anderen Immunsuppressiva, wie z. B. bei Glukokortikoiden mit längeren Krankenhausaufenthalten, in Betracht gezogen werden. Diese fallen durch das günstige Nebenwirkungsprofil von IVIG geringer an, sodass vergleichbare Gesamtkosten entstehen [1, 62, 214].

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits im Gefrierschnitt-Assay mit BP Immunkomplexen ein antiinflammatorischer Effekt von IVIG *in vitro* nachgewiesen. Bei der verwendeten IVIG Konzentrationen 40 mg/ml bestand eine signifikante Reduzierung der dermoepidermalen Spaltbildung im Vergleich zur Positivkontrolle. Es wurde unter anderem vermutet, dass IVIG seine antiinflammatorische Wirkung über eine Bindung an aktivierende

Fc γ -Rezeptoren vermittelt [95]. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde der Effekt mit gleichen IVIG-Konzentrationen auf Immunkomplex-aktivierte Neutrophile Granulozyten im ROS-Freisetzungs-Assay in dieser Arbeit untersucht. Als Autoantikörper wurde Serum von BP-Patienten verwendet. Eine Konzentration von 10 mg/ml und 20 mg/ml IVIG konnte *in vitro* keine signifikante Hemmung der ROS-Freisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle erreichen. Die maximale Hemmung der ROS-Freisetzung wurde bei 40 mg/ml statistisch signifikant erreicht.

Obwohl die klinische Wirksamkeit von IVIG bei dem bullösen Pemphigoid nachgewiesen wurde [61], bleibt der genaue Wirkmechanismus weiterhin unklar. Es sind mehrere Wirktheorien diskutiert worden. Ob diese den hemmenden Effekt im RFA erklären können wird hier kritisch hinterfragt.

Eine schnelle Wirkung von IVIG soll durch funktionelle Blockierung der aktivierenden Fc γ R (CD₁₆ und CD_{32a}) im Sinne einer reversiblen, kompetitiven Hemmung durch den Fc Teil von unspezifischen nicht-autoimmunen IgGs aus der IVIG-Suspension resultieren. Durch Blockierung der Fc γ R-Bindungsstellen könnte es zu keiner Immunkomplex-vermittelten Verkettung von aktivierten Fc γ R kommen und die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten würde ausbleiben. Der Fc γ I/CD₆₄ ist der einzige hoch affine Fc γ -Rezeptor von Neutrophilen Granulozyten, der zur Bindung von monomerem IgG fähig ist [205]. CD₆₄ wird bei inaktiven Neutrophilen Granulozyten jedoch nur gering auf der Zelloberfläche exprimiert [2]. Die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren CD₁₆ und CD_{32a} sind beide niedrig affine Rezeptoren, die gering bis kaum messbar monomeres IgG binden [205]. In der IVIG Suspension liegen nur monomere Immunglobuline und keine Immunkomplexe vor [190]. Die Bindung und Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren kann daher nur durch Immunkomplexe erfolgen, die in der IVIG-Suspension nicht vorhanden sind [190].

Als weitere Wirktheorie wurde eine Neutralisierung der Autoantikörper durch den F(ab')₂-Teil von Anti-idiotypischen Antikörpern in IVIG-Suspension diskutiert. Diese bilden Dimere über die Bindung ihrer korrespondierenden F(ab')₂-Bereiche [13, 107]. IVIG vermittelte bei diversen Autoimmunerkrankungen, mit ihren jeweils spezifischen Autoantikörpern, eine anti-inflammatorische Wirkung. Demnach müssten nach dieser Hypothese eine hohe Anzahl von verschiedenen Anti-idiotypischen Antikörpern in IVIG-Lösungen vorhanden sein. Auch konnte IVIG bei einer Versuchsreihe keine Pemphigus-Antikörper aus dem Serum von Pemphigus-Patienten binden und damit im Serum reduzie-

ren [25]. Im Rahmen der Vorversuche für diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein antiinflammatorischer Effekt von IVIG auch nach Entfernung aus der Zellsuspension vor Kontakt zu den Autoantikörpern möglich ist. Für die Versuchsbedingungen des RFA ist nach diesen Ergebnissen eine Wirkung von Anti-idiotypischen Antikörpern auszuschließen.

Eine $F(ab)_2$ -vermittelte Wirkung von IVIG scheint bei der Behandlung der Epidermolysis acuta toxica (Lyell Syndrom) vorzuliegen. Hier wird von einer Blockierung des Fas-Rezeptors, einem TNF- α bindenden Apoptose induzierenden Oberflächenrezeptor, durch in der IVIG Lösung enthaltene Autoantikörper ausgegangen [67]. Theoretisch wäre auch eine $F(ab)_2$ -vermittelte Wirkung von IVIG durch Autoantikörper z. B. gegen Fc γ -Rezeptoren denkbar. Es konnte aber gezeigt werden, dass intaktes IgG in IVIG und nur aus Fc-Fragmenten bestehende Lösungen ähnliche antiinflammatorische Effekte sowohl beim klinischen Einsatz als auch in verschiedenen Tiermodellen erreichen konnten. Damit wurde eine reine antiinflammatorische Wirkung von IVIG über $F(ab)_2$ ausgeschlossen [190].

Auch eine Beeinflussung des Komplementsystems sowie eine Modulation von Zytokinen und Zytokin-Antagonisten durch IVIG wurde diskutiert [46, 62, 85, 107]. Das Komplementsystem ist kein Bestandteil des Versuches und kann deshalb vernachlässigt werden. Auch machen die Versuchsbedingungen mit hauptsächlich Neutrophilen Granulozyten als Effektor-Zellen und einer relativ kurzen Gesamtversuchsdauer mit Vorinkubation und Reaktionszeit von ca. drei Stunden eine IVIG-vermittelte Modulation von Zytokinen und Zytokin-Agonisten unwahrscheinlich.

In einer klinischen Studie über die IVIG-Therapie von Pemphigus vulgaris stellte Bystryn et al. eine starke Senkung der pathogenen Pemphigus-Antikörper um ca. 70 % innerhalb einer Woche fest. Nach Meinung der Arbeitsgruppe ist der Effekt der Antikörper-Senkung zu stark, als das es mit einer Hemmung der IgG-Synthese oder Bindung an anti-idiotypischen Antikörpern zu erklären wäre. Eine Bindung von IVIG an Pemphigus-Antikörper konnte ausgeschlossen werden. Als Wirktheorie wird durch die hochdosierten IVIG-Konzentrationen eine unphysiologische *in vivo* Erhöhung des Gesamt-IgGs, welches dann zu einem gesteigerten Katabolismus aller IgG-Molekülen führt, angenommen [25]. Die Halbwertszeit und der Katabolismus von humanen, im Serum zirkulierendem, freiem IgG ist unter anderem über den neonatalen Fc-Rezeptors (FcRn) geregelt. FcRn ist ein mit den MHC-I-Molekülen verwandter Rezeptor und wird unter anderem auch auf

Neutrophilen Granulozyten exprimiert. FcRn bindet IgG und schützt es dadurch vor intrazellulären Abbau so dass es recycelt werden kann. Durch das Überangebot von IgG durch IVIG kommt es der Theorie nach zu einer Absättigung der FcRn. Die sonst ebenfalls recycelten Autoantikörper untergehen einem verstärkten Katabolismus [72, 106, 190, 262, 278]. In einem BP-Mausmodell konnte Li et al. diesen Effekt von IVIG bestätigen. Neben der klinischen Besserung kam es zu einer Reduzierung der Gesamthalbwertszeit der Autoantikörper im Maus-Serum. FcRn-knockout-Mäuse waren gegenüber der Wirkung der BP-Antikörper resistent, bildeten keine Blasen aus und zeigten ebenfalls eine reduzierte Halbwertszeit der Autoantikörper. Zusätzlich konnte IVIG den erhöhten Immunglobulin-Katabolismus bei FcRn-knockout-Mäusen nicht weiter verstärken [141]. Nach dieser Theorie wirken die Immunglobuline in der IVIG-Lösung einzeln betrachtet nicht antiinflammatorisch. Nur die erhöhte Konzentration ergibt über den Gesamteffekt eines erhöhten Katabolismus die indirekte antiinflammatorische Wirkung [190]. Für den verwendeten *in vitro* RFA kann aber diese Wirktheorie über FcRn Rezeptoren bei unter anderem fest gebundenen Immunkomplexen, was eine intrazelluläre Aufnahme bzw. einen Katabolismus unmöglich macht, nicht als Erklärung für die gemessene, rasche antiinflammatorische Wirkung von IVIG dienen.

Der durch IVIG verursachte Hemmeffekt im RFA müsste bei Ausschluss einer $F(ab')_2$ -abhängigen Wirkung durch den Fc-Teil der Immunglobuline vermittelt werden. Nach neueren Erkenntnissen bestimmt unter anderem der Sialysations-Zustand von der Fc-Regionen, ob Immunglobuline anti- oder proinflammatorisch wirken [112]. IgG mit Sialinsäure, gebunden über eine 2,6-Bindung an der Zuckerkette von Asparagin₂₉₇ im IgG-Fc-Teil, wirkt antiinflammatorisch [10]. Da durch Erhöhung des Sialysierungs-Grades die IgG-Bindungsfähigkeit zu FcγR abnimmt [11], welche per se auf Neutrophilen Granulozyten eine geringe Aktivität für monomere IgG besitzen [205], besteht ein weiterer Grund zum Ausschluss der Wirktheorie über eine kompetitive Hemmung der FcγR durch IVIG. Sialisiertes IgG müsste daher seine Wirkung über einen anderen Rezeptor vermitteln. In der Literatur sind Zelladhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Lektine bekannt, welche Sialinsäuren binden können. In Frage kommen Selektin-Rezeptoren aus der Klasse der c-Typ-Lektine und Siglecs (*sialic acid binding Ig-like lectins*) aus der Klasse der i-Typ-Lektine [10]. L-Selektin, P-Selektin, E-Selektin und Siglec-9 werden auch auf Neutrophilen Granulozyten exprimiert [44, 261]. Diese Wirktheorie weiter verfolgend soll es nach der Arbeitsgruppe um Nimmerjahn et al. durch Bindung von sialysierten Immunglobulinen

an Zelladhäsionsmoleküle zu einer Hochregulation von inhibitorischem Fc γ R (CD_{32b}) auf Immunzellen kommen. Durch das vermehrte Vorhandensein von CD_{32b} auf der Zelloberfläche bedarf es einer höheren Konzentration von Immunkomplexen, um proinflammatorisch zu wirken [10, 190]. C-Typ-Lektin SIGN-R1 (*specific Icam-3 grabbing nonintegrin-related 1*) auf murinen regulatorischen Makrophagen und sein humanes Ortholog DC-SIGN (*dendritic-cell specific Icam-3 grabbing nonintegrin/ CD₂₀₉*) auf Dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten wurden eine Rolle in dieser Wirktheorie zugesprochen. Eine Bindung von sialysiertem IgG an DC-SIGN auf Dendritischen Zellen in humanisierten DC-SIGN-Mäusestämmen führt durch Produktion von IL 33 zur Auslösung eines TH₂-Zytokinprofils mit IL4 Sekretion durch basophile Granulozyten. IL 4 führte danach zur Hochregulation von CD_{32b} auf Effektorzellen, z. B. Effektor-Makrophagen [9].

Nur 1-2 % der IgGs in der IVIG-Lösung besitzen den sialysierten Zustand, weshalb eventuell die hohen IVIG-Dosen zum Erreichen des therapeutischen Effekts notwendig sind. Eine Anreicherung mit diesen speziellen IgGs oder eine Herstellung von rekombinanten 2,6-sialysierten IgG1-Fc-Fragmenten erzielt gleiche bis bessere (10fach stärkere Wirkung) antiinflammatorische Effekte in deutlich geringeren Dosen als die Standard-IVIG-Dosierungen im Mausmodell [10, 190, 214]. Diese Tatsache mindert die Gewichtung der bereits beschriebenen Wirktheorie von einer Sättigung des FcRn-Rezeptors. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass bei im Vergleich niedrigen Konzentrationen mit sialysierten IVIG ein anti-inflammatorischer Effekt ohne Steigerung des Immunglobulin-Katabolismus auftrat [190].

Eine *in vitro* Anwendung der angereicherten sialysierten Immunglobuline oder der rekombinanten sialysierten IgG1-Fc-Fragmente ist nicht in der Literatur beschrieben.

Eine Bindung von sialysierten Immunglobulinen an anderen Rezeptoren außer den Fc γ R auf Effektorzellen ist unter den Bedingungen des ROS-Freisetzungs-Assay vorstellbar. Neutrophile Granulozyten besitzen Sialin-Säure bindende Rezeptoren, wie z. B. Siglecs. Siglec-2 (CD₂₂) ist als inhibitorischer Rezeptor auf B-Lymphozyten bekannt [44]. Demnach könnte der antiinflammatorische Effekt von IVIG auf aktivierte Neutrophile Granulozyten durch sialysiertes IgG über Sialin-Säure-bindende Rezeptoren vermittelt sein. Aktuell existieren dazu aber keine experimentalen Daten. Um dieser Wirktheorie weiter zu folgen, wäre als nächster Schritt die gemeinsame Inkubation von IVIG oder aufgereinigtem sialysiertem Immunglobulinen und z. B. Siglec-Inhibitoren notwendig.

Die *in vivo* vermutete Rolle von Effektor-Makrophagen ist als Wirktheorie bei dem RFA vernachlässigbar. Aber der Effekt einer Hochregulation von CD_{32b} mit resultierender Verminderung der proinflammatorischen Wirkung von Immunkomplexen wäre durchaus vorstellbar. Als Ansatz müsste die Anzahl von CD_{32b} auf aktivierten Neutrophilen Granulozyten ohne oder mit IVIG-Inkubation via FACS bestimmt werden.

Zusammenfassend verbleibt für den hier verwendeten RFA mit BP-Antikörpern als mögliche Theorien zur antiinflammatorischen Wirkung von IVIG der Effekt von sialysierten IgG über Bindung an Alternativ-Rezeptoren neben den FcγR-Rezeptoren, mit oder ohne nachfolgender Hochregulation von CD_{32b}. Eine F(ab')₂-vermittelte antiinflammatorische Wirkung im Sinne von im IVIG enthaltenen Autoantikörpern und eine Modulation von Zytokinen und Zytokin-Agonisten über noch unbekanntes Signalkaskaden durch IVIG ist eher unwahrscheinlich.

Bei der Therapie von BP und EBA ist IVIG eine nebenwirkungsarme Alternative zu Cortisonpräparaten, welches aktuell noch eine „*second line*“ Rolle einnimmt [60, 93]. Recombinante sialysierte Fc-Fragmente, welche eine deutlich potentere antiinflammatorische Wirkung als IVIG erreichen, sind aktuell in der Entwicklung und stehen kurz vor einem klinischen Einsatz [264].

4.2 Dimethylfumarat – antiinflammatorische Wirkung des lange bekannten Psoriasismedikament im Gefrierschnitt-Assay

Im Gefrierschnitt-Assay konnte 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml DMF die dermoepidermale Spaltbildung reduzieren. Diese Effekte waren statistisch signifikant. Ein zytotoxischer Effekt von DMF mit Induktion von Zelltod wurde bereits ausgeschlossen. *In vitro* war bei Neutrophilen Granulozyten nach einer 3 h Inkubation mit DMF 5-15 µg/ml in der Annexin-Durchflusszytometrie keine Apoptoseeigung nachzuweisen. Erst bei längerer Inkubationszeit (18 h) trat Apoptose auf [181].

Fumarsäure wird seit ca. 50 Jahren in der Therapie der Schuppenflechte (Psoriasis vulgaris) eingesetzt [181]. 1994 wurde Fumaderm® als aufgereinigtes Präparat aus DMF und Monomethylfumarat (MMF) in Deutschland zur Therapie von Psoriasis zugelassen [176].

Neben dermatologischen Erkrankungen zeigten Fumarsäure-Derivaten auch bei anderen Erkrankungen ein vielversprechendes antiinflammatorisches Potential [167]. So wurde DMF unter dem Handelsnamen Tecfidera[®] 2014 zur Therapie der schubweise remittierenden Multiplen Sklerose in Europa zugelassen [66].

In der Literatur werden Fumarsäure-Derivaten mehrere Wirkmechanismen zugesprochen. Die Effekte wurden dabei auf unterschiedliche Zellarten beobachtet [167]. Die Auswirkung von Fumarsäure-Derivaten auf Neutrophile Granulozyten ist bisher kaum betrachtet worden. Als eine der ersten Arbeiten wiesen 1993 Nibbering et al. *in vitro* eine Hemmung der FMLP induzierten ROS-Freisetzung aus Neutrophilen Granulozyten durch MMF nach [189]. Andere Autoren konnten hingegen diesen Effekt auf Neutrophile Granulozyten nicht bestätigen. In Monozyten verstärkte MMF sogar die ROS-Freisetzung [277].

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezielt der Einfluss von DMF auf Neutrophile Granulozyten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Zusätzlich zur Reduktion der dermo-epidermalen Spaltbildung hemmte oder reduzierte DMF *in vitro* bei Neutrophilen Granulozyten die Aktivitäts-induzierte Oberflächenmolekülexpression (CD63L, CD11b, CD66b), die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der ROS-Freisetzung, die Formung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) sowie die Migration und die Phagozytosefähigkeit. *In vivo* verhinderte DMF im passiven EBA-Mausmodell die pathogonomische Blasenbildung [181].

Vier in der Literatur beschriebene potentielle Wirkungstheorien werden hinsichtlich des erzielten antiinflammatorischen Effekts von DMF-Derivaten im GA im Folgenden diskutiert: 1) Hemmung des NF- κ B-Systems, 2) Beeinflussung des Glutathion-Systems, 3) Interaktion mit dem Mitogen-aktivierten Protein Kinase System (MAP-Kinase) und 4) DMF Agonismus für den Nikotinsäure-Rezeptor 1 (HCAR2/ GPR109A).

Viele Publikationen sehen einen Effekt von DMF in der Hemmung des NF- κ B-Systems. Unter anderem ist laut den Autoren eine Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [176], Apoptose von Lymphozyten [249], Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten [155, 211, 258], Änderung einer T_H1-Immunantwort in eine T_H2-Immunantwort [48] und Verhinderung der Zelldifferenzierung von Dendritischen Zellen [201] auf eine Hemmung des NF- κ B-Systems durch Fumarsäure-Derivaten zurückzuführen. NF- κ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, welcher aus Homo- oder Heterodimeren der Rel-Proteinfamilie besteht (z. B. RelA/p65, NF- κ B1/p50) und als zentraler Regulator von Im-

munantwort, Entzündung, Zellproliferation und Apoptose gilt [258]. Im Ruhezustand bildet NF- κ B einen inaktiven Komplex mit seinem Inhibitor von κ B (I κ B) im Zytoplasma [154, 258]. Nach Aktivierung durch Lösung aus dem Komplex mit I κ B kommt es nach Translokation von NF- κ B in den Zellkern zur Genaktivierung. Dieser „*nuclear entry*“ von NF- κ B soll von DMF gehemmt werden [155, 176, 201, 258]. *In vitro* inhibierte DMF in humanen dermalen Fibroblasten den Zytokin-induzierten „*nuclear entry*“ von NF- κ B1/p50, ohne dass die Translokation von RelA/p65 beeinflusst wurde [258]. In humanen Endothelzellen verhinderte DMF *in vitro* zusätzlich auch die Zytokin-induzierte Translokation von p65 und c-Rel [154]. Die nukleäre Translokation von anderen Transkriptionsfaktoren wie EGR-1 (*Early growth response protein 1*), AP-1 (*Activator protein 1*) und SP1 (*Specificity protein 1*) wurde nicht beeinflusst. DMF hatte laut den Autoren in humanen Endothelzellen keinen inhibitorischen Einfluss auf den Komplex aus inaktivem NF- κ B und I κ B und verhinderte nicht die Phosphorylierung und Degradierung von I κ B zur Freisetzung von NF- κ B oder die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors. Sie vermuten eine Hemmung des „*nuclear entry*“ möglicherweise durch Inhibition von aktuell nicht bekannten „Shuttle Proteinen“ oder durch Inaktivierung von NF- κ B durch Änderung der Phosphorylierung nach Lösung aus dem Komplex mit I κ B z. B. durch Änderung des Glutathione-Systems [154].

Es ist bekannt, dass DMF die Expression und Aktivität der Glutathion-S-Transferase induziert [154, 237]. Glutathion wird durch die Glutathion-S-Transferase kovalent an DMF gebunden und der intrazelluläre Level an Glutathion dadurch reduziert [172]. Glutathion ist ein wichtiges Element des intrazellulären Redoxsystems und beeinflusst verschiedene Signalkaskaden. Es wurde gezeigt, dass eine Depletion von Glutathion durch Erhöhung der Glutathion-S-Transferase Aktivität zu einer Down Regulation von p21^{ras}, einem Transmitterprotein der Ras-Onkogen-Familie, führt [172]. p21^{ras} ist unter anderem an der Phosphorylierung von p65, einem Element der Rel-Familie von NF- κ B beteiligt [8]. Die Phosphorylierung von den Rel-Proteinen des NF- κ B-Komplexes ist eine Voraussetzung für den „*nuclear entry*“ [201]. DMF könnte somit indirekt über die Beeinflussung des Glutathionsystems mit Glutathion-Reduktion und durch Down Regulation von Transmitterproteinen wie p21^{ras} das NF- κ B-System inhibitorisch beeinflussen [154]. Zusätzlich zu dieser Wirktheorie wird von einer weiteren Beeinflussung des Glutathionsystems durch Fumar säurederivate ausgegangen. Neben der hauptsächlich in der Literatur angegebenen initialen Reduzierung von intrazellulärem Glutathion wird im Verlauf von einer langfristigen Erhö-

hung der intrazellulären Glutathion-Konzentration in *in vitro* Versuchen mit bestimmten Zelllinien berichtet [167, 175, 187]. Das erhöhte Glutathion würde nach Ansicht der Autoren durch seine Eigenschaften als Antioxidans Redox-sensible Kinasen hemmen. Diese wären nicht mehr zur Phosphorylierung von in der Signalkaskade folgenden Proteinen, wie z. B. I κ B fähig. Der Inhibitor I κ B könnte sich dann nicht mehr aus dem Komplex mit NF- κ B-System lösen [185]. In jedem Fall beschreiben beide Theorien eine DMF-abhängige Änderung des Glutathion-Systems in verschiedenen Zelllinien, die zu einer Inhibition des NF- κ B-Systems führen können.

Durch die definierten Bedingungen und Limitationen des hier verwendeten *in vitro* Gefrierschnitt-Assays ist eine kritische Betrachtung der beschriebenen Wirktheorien möglich. Der Einfluss von Fumarsäure auf das NF- κ B-System mit Hemmung der Synthese von z. B. pro-inflammatorischen Zytokinen oder Oberflächenmoleküle kann wahrscheinlich für den *in vitro* Assay vernachlässigt werden. Generell sind Neutrophile Granulozyten zur Produktion von Zytokinen wie IL-8, MIP 1 α , MIP 1 β , GRO α , M-GSF und zur Auto-Stimulierung fähig [27, 58, 222]. Als wichtigster limitierender Faktor für diese Theorie bildet der zeitlichen Rahmen des Versuches von 3 Stunden, welcher Genaktivierung über Transkriptionsfaktoren, geschweige denn eine *de-novo* Synthese von Proteinen oder Zytokinen unwahrscheinlich macht. Des Weiteren liegen die entscheidenden Enzyme für die Vermittlung der Gewebeerstörung bereits vorgefertigt im Zytosol oder in den Granulas der reifen Neutrophilen Granulozyten [20, 136]. Zum endgültigen Ausschluss dieser Theorie müsste z. B. die Zytokin-RNA als Indikator einer *de-novo* Synthese innerhalb von 3 Stunden gemessen werden. Da der Einfluss von DMF auf das Glutathione-System als weitere Ursache für die Hemmung des NF- κ B-Systems gesehen wird, würden die gleichen Ausschlusskriterien für diese Wirktheorie bestehen.

Auch das Mitogen-aktivierte Protein Kinase System (MAP-Kinase) wird als Wirkungsort von Fumarsäure-Derivaten gehandelt. Nach Peng et al. führt DMF in humanen Dendritischen Zellen zu einer Inhibition der MAP-Kinase ERK 1 (*Extracellular signal regulated Kinase 1*) und ERK 2 und damit auch zur Hemmung der Phosphorylierung von in der Signalkette folgenden Kinasen, wie der *Mitogen stress-activated Kinase 1* (MSK1). MSK1 beeinflusst unter anderem die Phosphorylierung von dem NF- κ B-Komplexbestandteil p65. Auch in Mikroglia-Zellen konnte *in vitro* eine Hemmung der Phosphorylierung von ERK 1/2 durch DMF nachgewiesen werden [266]. In der Publikation unserer Arbeitsgruppe wurde in Neutrophilen Granulozyten eine DMF-abhängige Änderung der Phosphorylie-

nung von zentralen Kinasen des MAP-Kinase-Systems wie Akt und p38 nachgewiesen. Eine Hemmung der Phosphorylierung von ERK 1/2 durch DMF in aktivierten Neutrophilen Granulozyten war nicht nachweisbar [181]. Insgesamt würde nach den Bedingungen des hier verwendeten GA ein DMF-Effekt durch Hemmung von Elementen des MAP-Kinase-Signalweges erklärbar sein.

Die bisher genannten Theorien über die Wirkung von Fumarsäure-Derivaten nehmen eine intrazelluläre Wirkung an, welche aufgrund der lipophilen Eigenschaften des Wirkstoffs plausibel erscheint [221, 258]. Zusätzlich wird in der Literatur ein Effekt von Fumarsäure auf membrangebundene Rezeptoren beschrieben. DMF und MMF mit deutlich höherer Affinität sind Agonisten für den Nikotinsäure-Rezeptor 1 (HCAR2/ GPR109A), einem G-Protein gekoppeltem membranständigen Rezeptor [32, 245]. Dieser inhibitorische Gi-Rezeptor befindet sich vor allem auf reifen Neutrophilen Granulozyten [128, 245]. In einem *in vivo* Multiple Sklerose-Mausmodell zeigte sich kein antiinflammatorischer Effekt von Fumarsäure in HCAR2-knockout-Mäusen [32]. Ob Fumarsäure-Derivate über einen Agonismus mit dem Gi-Rezeptor Nikotinsäure-Rezeptor 1 einen antiinflammatorischen Effekt in Neutrophilen Granulozyten verursachen kann, ist in der Literatur nicht beschrieben. Welche Signalkaskaden beteiligt sind, oder ob es eine Verbindung zu dem MAPK-Kinase System gibt, ist ebenfalls unklar [128, 245]. Eine DMF-vermittelte Beeinflussung eines Gi-Rezeptors ist nach den gegebenen Versuchsbedingungen des in dieser Arbeit verwendeten GA vorstellbar.

In vivo wird das schlussendliche antiinflammatorische Ergebnis als Kombination der unterschiedlichen Effekte von Fumarsäure Derivaten auf verschiedene Zelltypen angenommen [155]. Die Ergebnisse der vorwiegend mit Psoriasis-Patienten durchgeführten klinischen Studien dämpfen die Aussagekraft der *in vitro* Ergebnisse. *In vitro* zeigte MMF nur in erhöhten Konzentrationen, welche im Verhältnis deutlich über der gemessenen Plasmakonzentration nach oraler Einnahme von Fumarsäure-Präparaten lagen, antiinflammatorische Effekte. DMF verursachte hingegen *in vitro* schon in geringen Dosen Effekte, wird aber im Plasma von Psoriasis-Patienten kaum nachgewiesen. Stattdessen ist MMF als Hydrolyse-Spaltprodukt von DMF deutlich im Plasma vorhanden. Als Ursache wird eine Hydrolyse von DMF zu MMF in der gastrointestinalen Mukosa vermutet. Aufgrund dieser Pharmakokinetik wurde zunächst DMF als Vorstufewirkstoff und MMF als biologisch aktiver Wirkstoff angenommen [147, 167, 210]. Neuere Arbeiten widersprechen

dieser Vorstellung und beschreiben keine komplette Hydrolyse von DMF in der Mukosa. Es wird vermutet, dass DMF seinen antiinflammatorischen Effekt innerhalb des Portalvenensystems erreicht [208-209]. Insgesamt wird eine Beeinflussung des intrazellulären Redoxsystems durch eine initiale intrazelluläre Reduzierung von Glutathion in Zellen des Immunsystems als wichtiger *in vivo* Effekt angesehen. Durch den Verbrauch von Glutathion soll unter anderem die Apoptose von T-Zellen induziert werden [167]. Aufgrund dieses Wirkungseffekts ist die persistierende Lymphozytopenie als wichtige, kontrollbedürftige Nebenwirkung bei der Therapie mit DMF zu erklären. Sie gilt bei der Therapie der schubweise remittierenden Multiplen Sklerose mit Tecfidera[®] als Risikofaktor für das Auftreten der sehr seltenen progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) [45, 146]. Zusammenfassend konnte hier im Gefrierschnitt-Assay ein deutlicher antiinflammatorischer Effekt auf Neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Der schlussendliche *in vitro* Wirkmechanismus ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Insgesamt werden Fumarsäure-Derivate vom Nebenwirkungsprofil betrachtet als gut verträgliche Wirkstoffen eingeschätzt. Sie bleiben im Vergleich zu anderen immunsuppressiven Medikamenten wie Cortison deutlich nebenwirkungsärmer [5, 177, 194]

4.3 Wirkung des HSP90-Inhibitor 17-DMAG im Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay mit Epidermolysis bullosa acquisita Autoantikörpern

HSP90-Inhibitoren, wie 17-DMAG, werden in der Onkologie in klinischen Studien als Chemotherapeutikum untersucht [131, 198, 206]. Ein Einsatz von HSP90-Inhibitoren bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen bietet sich ebenfalls an. Klinische Studien hierfür existieren zurzeit nicht. Über einen Einsatz bei an bullösen Autoimmundermatosen erkrankten Patienten wird diskutiert [252]. Auch die Effekte von HSP90-Inhibitoren auf humane Neutrophile Granulozyten sind kaum in der Literatur beschrieben [30].

In dieser Arbeit konnte *in vitro* im Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay mit EBA-Autoantikörpern, eine dosisabhängige Inhibition der inflammatorischen Wirkung von aktivierten Neutrophilen Granulozyten durch 17-DMAG nachgewiesen werden. Die 10 µmol/l 17-DMAG Dosis verursachte keine messbare Inhibition der ROS-Freisetzung und der dermo-epidermalen Spaltbildung. Die *in vitro* Dosis von 100 µmol/l zeigte bereits

eine Inhibition der ROS-Freisetzung und der dermo-epidermalen Spaltbildung im Vergleich zur Positivkontrolle. Dies war aber nur bei dem ROS-Freisetzungs-Assay statistisch signifikant. Eine komplette, statistisch signifikante Hemmung der dermo-epidermalen Spaltbildung und eine Reduktion der ROS-Freisetzung auf das Niveau der Negativkontrolle war durch den Einsatz von 250 $\mu\text{mol/l}$ 17-DMAG nachweisbar. Ein möglicher toxischer Effekt bei höherer 17-DMAG-Dosierung wurde bereits ausgeschlossen. Es zeigte sich keine Apoptoseneigung bei der Inkubation von Neutrophilen Granulozyten mit den verwendeten 17-DMAG-Konzentrationen für die maximale Versuchsdauer in der Durchflusszytometrie mit Annexin V/Propidium-Iodid-Färbung (Zell-Viabilitäts-Test) [252].

HSP90 bindet als Chaperone an andere Proteine, um sie nach der Synthese korrekt zu falten und für ihre Funktion zu stabilisieren [43, 203, 253]. Das Molekül besitzt auf dem N-terminalen Strang eine ATP-Bindungsstelle, die für diese Funktion essentiell ist. HSP90-Inhibitoren greifen dort an und lösen die Komplexe mit den „Klienten Proteinen“ auf [51, 81, 165]. Da ungefähr 1-2 % der zellulären Proteine auf die Chaperon Funktion von HSP90 angewiesen sind, beeinflussen HSP90-Inhibitoren damit mehrere, verschiedene Proteinsysteme [253]. Durch die vielen möglichen Angriffsorte ist keine sichere Aussage möglich, welcher Wirkort schlussendlich entscheidend für den messbaren Effekt von 17 DMAG war. Auch ein Verdecken von Wirkeffekten durch gleichzeitige Inhibition von mehreren Proteinen ist möglich. Nach der Literatur bestehen für den antiinflammatorischen Effekt von HSP90-Inhibitoren drei mögliche Wirkprinzipien: 1. Hemmung von Enzymen, die auf die Funktion von HSP90 angewiesen sind, 2. Hemmung einer HSP90-abhängigen Signalkaskade und 3. Freisetzung und damit Aktivierung von inhibierenden Bindungspartnern aus dem HSP90-Komplex [30, 50, 68, 160-161, 165, 242, 251-252, 267, 274]. An den folgenden Beispielen wird verdeutlicht, ob die Wirkprinzipien unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen des RFAs und des GA als stattgefundene Effekte von 17-DMAG vorstellbar sind.

Chen et al. wiesen eine HSP90-Abhängigkeit der NADPH-Oxidase 2 (NOX_2), einem wichtigen Enzym bei der Herstellung von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der ROS-Freisetzung von humanen Neutrophilen Granulozyten nach. In PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetat*)-stimulierten humanen Neutrophilen Granulozyten von gesunden humanen Spendern und Neutrophilen Granulozyten einer *human promyelocytic leukemia cell line* (HL-60) kam es *in vitro* durch den Einsatz von Geldanamycin zu einer Hemmung der Superoxid-Produktion. Nach der Arbeitsgruppe benötigt die NOX_2 zur Produktion von

reaktiven Sauerstoffspezies die stabilisierende Bindung von HSP90 an den C-Terminus des Enzyms [30-31]. Ebenso konnten eine Interaktion von Matrix-Metalloproteinasen mit HSP90 nachgewiesen werden, welche vermutlich die Chaperone-Funktion zur Aktivierung benötigen. Im Serum von EBA-Patienten bildete extrazelluläres HSP90 einen Komplex mit der Matrix-Metalloproteinase 12 (MMP-12) und 2 (MMP-2) aus [252]. Für die hier verwendeten Assays wären diese Effekte von HSP90-Inhibitoren sehr gut vorstellbar. NOX₂ und Matrix-Metalloproteinasen sind wichtige Enzyme bei der Pathophysiologie von EBA, da sie durch die Produktion von ROS und in ihrer Funktion als Proteinasen direkt bei der Gewebeerstörung mitwirken. Eine Inhibition ihrer Funktion wäre ein entscheidender Effekt von 17-DMAG in den hier verwendeten Assays.

Neben diesem Angriffsort ist auch die Inhibition von HSP90 abhängigen Signalkaskaden beschrieben. In Zytokin stimulierten humanen Makrophagen reduzierte 17-DMAG *in vitro* die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, was wiederum zu einer Reduktion der Chemokin-Expression führt [50, 160, 162, 226, 242, 267]. Wie bereits aufgeführt, können genomische Effekte über Transkriptionsfaktoren und Proteinneusynthese aufgrund der Versuchsbedingungen im RFA und GA am ehesten ausgeschlossen werden. Eine Blockierung von anderen Signalkaskaden durch HSP90-Inhibitoren, wie z. B. den MAP-Kinase (*Mitogen activated Proteine Kinase*)-Signalwegen wäre hingegen seit dem Nachweis einer Hemmung der dermo-epidermalen Spaltbildung im GA bei Verwendung von ERK 1 und 2 (*Extracellular signal-regulated Kinase*)-Inhibitoren als Wirkmechanismus gut mit den Versuchsbedingungen vereinbar [95]. So konnte EC144, ein synthetischer HSP90-Inhibitor in RAW 264.7 Zellen (*Mouse monocyte macrophage*) die LPS (*Lipopolysaccharid*) induzierte TLR4 (*Toll like receptor 4*) Signalkaskade durch Hemmung von ERK 1/2, MEK 1/2, JNK (*Janus-kinase*) und p38 MAPK unterbrechen [274].

Die bisher genannten Wirktheorien gehen von einem Verlust der notwendigen HSP90-Funktion beim Einsatz von Inhibitoren aus. In der Literatur wird zudem eine Freisetzung von Bindungspartnern aus dem HSP90-Komplex durch HSP90-Inhibitoren berichtet. Als Beispiel kann der Transkriptionsfaktor HSF-1 (*Heat Shock factor-1*), welcher in Nicht-Stress-Situationen an das Chaperon gebunden ist und erst durch zellulären Stress oder durch den Einsatz von HSP90-Inhibitoren aus seinem Komplex befreit wird, genannt werden. HSF-1 gilt als Hauptregulator des Heat Shock Response Systems und wird durch HSP90 reguliert [68]. Unter anderem führt HSF-1 zur Induktion der Produktion von HSP70 und HSP40 sowie zur Inhibition anderer Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB [50, 160-161,

165, 242, 267]. Besonders HSP70 gilt als Gegenspieler von HSP90 [31] und zeigt eine erfolgreiche Inhibition von HSP90 an [251]. Die intrazelluläre HSP70-Erhöhung führt insgesamt zur Aktivierung von Ubiquitin-Ligasen, einem Abbauenzymkomplex. Zum Beispiel bindet HSP70 an NOX₂ und verursacht deren Degradation [31]. Da durch HSF-1 als Transkriptionsfaktor ein genomischer Effekt vorliegt, ist dieser Effekt von HSP90-Inhibitoren aufgrund der zeitlichen Begrenzung der Assays am ehesten vernachlässigbar. Zusammenfassend kommen als Wirkmechanismus von 17-DMAG die Hemmung von Enzymen, wie NOX₂ und Matrix-Metalloproteinasen, die direkt an der Gewebeerstörung beteiligt sind und eine Hemmung des MAP-Kinase-Signalweges für die verwendeten *in vitro* Assays in Frage.

Generell werden *in vivo* Effekte von HSP90-Inhibitoren bei Autoimmunerkrankungen kaum in der Literatur berichtet. Bei BP-Patienten konnte insgesamt eine niedrige extrazelluläre HSP90-Konzentration im Serum und eine hohe dermale Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine Rolle von HSP90-Inhibitoren bei der Pathophysiologie dieser Autoimmunerkrankung vermuten. Gleichzeitig würde diese ungleiche Konzentrationsverteilung einen Einsatz von HSP90-Inhibitoren begünstigen [252-253].

Kasperkiewicz et al. zeigten in einem aktiven EBA-Mausmodell einen immunsuppressiven Effekt durch 17-DMAG. Die klinischen Zeichen, die Autoantikörper-Produktion und die dermalen Entzündungsinfiltrate konnten durch den HSP90-Inhibitor unterdrückt werden. Diese Ergebnisse werden besonders durch die potente Hemmung der T-Zell-Proliferation durch HSP90-Inhibitoren erklärt [114].

Zusätzlich zu dem möglichen Einsatz bei Autoimmunerkrankungen sind HSP90-Inhibitoren in anderen medizinischen Fachbereichen aktuell Gegenstand der Diskussion. Neben den bereits begonnenen onkologischen Studien existieren vielversprechende Ergebnisse in der Neurologie bei der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen sowie in der Kardiologie zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen [31, 161, 165, 246]. Ziel ist es, die unselektiven, unspezifischen HSP90-Inhibitoren zu einem selektiven und damit nebenwirkungsärmeren Inhibitor weiter zu entwickeln. Die kumulative Wirkung von HSP90-Inhibitoren mit vielen verschiedenen Proteinklienten zu interagieren macht sie zu „dirty drugs“ und führt zu einem unspezifischen, teilweise nicht vorhersehbaren Nebenwirkungspotential. Daher ist ein therapeutischer Einsatz im Rahmen von Studien aktuell

nur bei fortgeschrittenen schweren Erkrankungen mit fehlenden Therapieoptionen freigegeben.

17-DMAG als Vertreter der HSP90-Inhibitoren stellt sich als potenter, antiinflammatorischer, aber gleichzeitig unselektiver Wirkstoff heraus. Weitere *in vitro* und *in vivo* Tests zur Klärung der gesamten kumulativen Wirkung sind notwendig, um klinische Studien bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen zu beginnen.

4.4 Limitationen der verwendeten Assays

Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay stellen ein deutlich reduziertes Abbild der *in vivo* Situation dar. Mit Antigen, Antikörper und Neutrophilen Granulozyten liegen nur drei Versuchselemente vor. Es wird *in vitro* nur der inflammatorische Part der Pathophysiologie von EBA und BP simuliert. Daraus ergibt sich die Problematik, die in diesen Versuchen gewonnenen Daten mit der *in vivo* Situation in Beziehung zu setzen. Eine Betrachtung der Krankheitsentstehung mit Toleranzverlust oder die Berücksichtigung des in 30 - 50 % der Fälle vorliegenden mechanobullösen EBA-Typs [137, 268] ist nicht gegeben. Die Rolle von weiteren Inflammationszellen (Lymphozyten, Monozyten und Mastzellen) und des Komplementsystems sowie der Vorgang der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten zur DEJ ist mit den verwendeten Assays nicht darstellbar. Komplementsystem und Mastzellen sind hauptsächlich für die Rekrutierung von Granulozyten zu den Immunkomplexen in der DEJ durch Chemotaxis verantwortlich [148]. Da das Zellsuspensat aus aufgereinigten Neutrophilen Granulozyten direkt auf die Hautschnitte bzw. direkt in die Nähe der Autoimmunkomplexe gebracht wird, können alle Elemente, die an der Zellrekrutierung beteiligt sind, vernachlässigt werden [234].

Beim inflammatorischen Typ von EBA und beim murinen BP-Modell liegt *in vivo* histopathologisch ein Neutrophilen Granulozyten dominiertes Hautinfiltrat vor [150, 229]. Im Gegensatz dazu sind bei BP-Patienten Eosinophile Granulozyten die am häufigsten anzutreffenden Zellen im Bereich der DEJ [121]. Eine Isolation von Eosinophilen Granulozyten aus dem Vollblut von gesunden Probanden ist bei physiologisch deutlich geringerem Vorkommen im Vergleich zu Neutrophilen Granulozyten technisch aufwendiger [3,

182]. Auch die in der Literatur beschriebenen *in vitro* BP-Versuche verwendeten wahrscheinlich aus Gründen der Reproduzierbarkeit Neutrophilen Granulozyten [70, 232, 234]. Bei der Gewinnung von Neutrophilen Granulozyten als Effektorzellen werden mit PolymorphprepTM und Dextran-Sedimentation zwei Techniken verwendet, die hauptsächlich Neutrophile Granulozyten isolieren sollen. Eine komplette Entfernung von Mononukleären Zellen ist bei beiden Verfahren, besonders bei der Dextran-Sedimentation, nicht auszuschießen. Es wurde gezeigt, dass aufgereinigte Mononukleäre Zelllösungen nicht in der Lage sind im GA an die Immunkomplexe in der DEJ zu binden und eine dermo-epidermale Spaltbildung auszulösen [232].

Alle verwendeten Neutrophilen Granulozyten stammen von jeweils 17 verschiedenen gesunden Spendern. Die Immunkomplexe in beiden Assays interagieren über membrangebundene Fc γ -Rezeptoren mit den Neutrophilen Granulozyten [232, 273]. Für den Fc γ IIa-Rezeptor (CD₃₂) und Fc γ IIIb-Rezeptor (CD₁₆) existieren strukturell und funktionell unterschiedliche Allel-Polymorphismen. Ein Autoantikörper könnte somit eine unterschiedlich starke inflammatorische Reaktion bei Neutrophilen Granulozyten von verschiedenen Spendern verursachen [22]. Bei den gesunden Spendern wurde keine Detektierung des Fc γ Rezeptoren-Allotyps durchgeführt. Um einen möglichen Störeffekt durch genetischen Polymorphismus der Fc γ -Rezeptoren zu minimieren, wurde pro Versuchsreihe aus Positivkontrolle, Negativkontrolle und Pharmakonlösungen nur Neutrophile Granulozyten von einem Spender verwendet.

Beim GA ist nach der Inkubation eine Reinigung der Hautschnitte nötig, da sonst die Neutrophilen Granulozyten spätestens bei der HE-Färbung den Bereich der DEJ und damit die Spaltbildung überdecken. Dabei müssen diese vorsichtig mechanisch aus der Haut gewaschen werden. Bei einer vollständigen Spaltbildung auf ganzer Länge des Hautschnittes kommt es beim Waschvorgang gelegentlich zum Verlust der Spalthaut, sodass dieser Objektivträger bei der Auswertung nicht einbezogen werden darf. Die Schwierigkeit beim Gefrierschnitt-Assay liegt in der Datenauswertung und Bestimmung der prozentualen dermo-epidermalen Spaltbildung. Zwischen den eindeutigen Situationen, wie keine Spaltbildung (0 %) und dem Vorliegen einer kompletten Spaltbildung auf ganzer Länge der DEJ (100 %), musste die prozentuale dermo-epidermale Spaltbildung geschätzt werden.

Beim RFA werden alle Daten mit dem Photometer gemessen. Zusätzlich liegt kein fragiler Hautschnitt vor. Daher ist dieser Assay deutlich weniger störanfällig und liefert genauere Ergebnisse. Dabei liegt die AUC der Negativkontrolle nicht wie im Vergleich zum vollständig Fehlenden dermo-epidermale Spaltbildung beim GA bei 0 CPS. Da selbst inaktive Zellen ROS produzieren kann auch eine geringe ROS Produktion bei der Negativkontrolle gemessen werden [30].

Insgesamt sind beide Assays ungeachtet der genannten Limitationen unkomplizierte, gut zu reproduzierende Verfahren, welche signifikante Daten produzieren.

4.5 Ausblick

Die Nachteile, welche naturgemäß zwischen *in vivo* und *in vitro* Test vorliegen, schaffen auch Vorteile für die Beurteilung von erwarteten Wirkmechanismen. Durch die Assay Bedingungen ist es möglich in der Literatur beschriebene Wirkeffekte der verwendeten Wirkstoffe auszuschließen und Hinweis auf weitere, aktuell noch unbekannte Wirkmechanismen zu liefern. Zum Beispiel können bekannte antiinflammatorische Effekte, welche die Anwesenheit von anderen inflammatorischen Zellen benötigen oder zeitintensive Prozesse, wie genomische Wirkeffekte mit Proteinbiosynthese unter diesen Bedingungen als unwahrscheinlich für den erreichten *in vitro* Effekt angesehen werden.

Durch die Eingrenzung und vereinfachte Darstellung von Wirkeffekten bilden Ergebnisse des Gefrierschnitt-Assay und ROS-Freisetzungs-Assay die Grundlage für sich anschließende *in vivo* Versuche. Gewonnene Daten dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits veröffentlicht und bildeten den Ausgangspunkt für *in vivo* Versuche (Abbildung 24).

Substanz Assay	IVIG	17-DMAG	DMF
ROS-Release Assay	Unveröffentlichte Ergebnisse	Tukaj et al. 2015	Müller et al. 2016
Cryosection Assay	Dissertation K. Holdorf 2011	Tukaj et al. 2015	Müller et al. 2016
Passives Tiermodell	Schwab et al. 2015	--	Müller et al. 2016
Aktives Tiermodell	Hirose et al. 2015	Kasperkiewicz et al. 2011	Müller et al. 2016

- Durchführung des Assays
- Mitarbeit und Erlernen des Assays
- Keine Teilnahme am Assay

Abbildung 24: Übersicht über die verwendeten Substanzen/ Assays und die daraus folgenden veröffentlichten Ergebnisse. Orange Felder symbolisieren Ergebnisse, die in dieser Dissertation dargestellt werden. Diese wurden für 17-DMAG und DMF in Publikationen verwendet. Die grünen Felder stehen für die Mitarbeit und das Erlernen der Assays. Bei den hellblauen Feldern bestand keine Mitarbeit. Sie stellen die, zum Teil aus den *in vitro* Ergebnissen resultierenden, korrespondierenden *in vivo* Versuche dar.

5 Zusammenfassung

Die bullösen Autoimmundermatosen bullöses Pemphigoid und Epidermolysis bullosa acquisita gehören zu einer Gruppe von Autoimmunerkrankungen für deren Ausbruch ein initialer Toleranzverlust gegen körpereigene Strukturen der Haut ursächlich ist. Die dabei auftretende charakteristische Blasenbildung wird im Krankheitsverlauf durch Autoantikörper-vermittelten Immunreaktionen hervorgerufen. Bis heute umfasst die Therapie beinahe ausschließlich Cortison-gestützte Ansätze. Diese sind jedoch nebenwirkungsreich weshalb die Etablierung von neuen Therapieansätzen unerlässlich ist.

In dieser Arbeit wurde die potenzielle antiinflammatorische Wirkung von intravenösen Immunglobulinen, Dimethylfumarat und dem Heat Shock Protein 90-Inhibitor 17-DMAG anhand von zwei *in vitro* Versuchsansätzen näher untersucht. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Assays (ROS-Freisetzungs-Assay und Gefrierschnitt-Assay) stellen *in vitro* Modelle dar, mit denen Granulozyten-vermittelte Immunprozesse simuliert werden können, welche in den Autoimmundermatosen BP und EBA eine zentrale Rolle spielen.

Alle drei getesteten Substanzen waren *in vitro* in der Lage die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, gemessen an der Reduktion der ROS-Freisetzung oder der Reduktion der dermo-epidermalen Spaltbildung, Konzentrations-abhängig zu inhibieren. Somit konnte gezeigt werden, dass IVIG, Dimethylfumarat und der Heat Shock Protein 90-Inhibitor 17-DMAG einen Einfluss auf die Granulozyten-Aktivierung in den verwendeten Krankheitsmodellen nimmt. Ein exakter Wirkmechanismus ließ sich, auch aufgrund von verschiedenen potentiellen Angriffsorten der Substanzen, nicht finden. Diesbezüglich sind weitere Versuche notwendig.

Die gewonnenen Ergebnisse bilden einen Grundstein zur Entwicklung von neuen, Cortison-sparenden Therapiekonzepten für die Behandlung der beiden bullösen Autoimmundermatosen BP und EBA. Gleichzeitig ergeben sich wichtige Einblicke in die Wirkprinzipien der eingesetzten Stoffe/Substanzen und unterstützen damit neue Erkenntnisse der Entzündungs- und Autoimmunforschung zur weiteren Entwicklung von potentiell antiinflammatorischen Wirkstoffen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahmed, A.R., *Intravenous immunoglobulin therapy for patients with bullous pemphigoid unresponsive to conventional immunosuppressive treatment*. J Am Acad Dermatol, 2001. **45**(6): p. 825-35.
2. Akerley, W.L., 3rd, P.M. Guyre, and B.H. Davis, *Neutrophil activation through high-affinity Fc gamma receptor using a monomeric antibody with unique properties*. Blood, 1991. **77**(3): p. 607-15.
3. Akuthota, P., K. Capron, and P.F. Weller, *Eosinophil purification from peripheral blood*. Methods Mol Biol, 2014. **1178**: p. 13-20.
4. Alarcon-Segovia, D., A. Ruiz-Arguelles, and L. Llorente, *Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells*. Immunol Today, 1996. **17**(4): p. 163-4.
5. Altmeyer, P., R. Hartwig, and U. Matthes, *[Efficacy and safety profile of fumaric acid esters in oral long-term therapy with severe treatment refractory psoriasis vulgaris. A study of 83 patients]*. Hautarzt, 1996. **47**(3): p. 190-6.
6. Ambach, A., D. Zillikens, B. Klingert, A.A. Hartmann, and G. Burg, *[Immune phenotyping of mononuclear infiltrate in bullous pemphigoid]*. Hautarzt, 1992. **43**(2): p. 81-5.
7. Amber, K.T., P. Staropoli, M.I. Shiman, G.W. Elgart, and M. Hertl, *Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris*. Exp Dermatol, 2013. **22**(11): p. 699-704.
8. Anrather, J., V. Csizmadia, M.P. Soares, and H. Winkler, *Regulation of NF-kappaB RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21(ras) and protein kinase Czeta in primary endothelial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13594-603.
9. Anthony, R.M., T. Kobayashi, F. Wermeling, and J.V. Ravetch, *Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 110-3.
10. Anthony, R.M., F. Nimmerjahn, D.J. Ashline, V.N. Reinhold, J.C. Paulson, and J.V. Ravetch, *Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc*. Science, 2008. **320**(5874): p. 373-6.
11. Anthony, R.M., F. Wermeling, M.C. Karlsson, and J.V. Ravetch, *Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19571-8.
12. Barber, H.W., *Epidermolysis bullosa acquisita*. Proc R Soc Med, 1948. **41**(2): p. 105.
13. Beckers, R.C., A. Brand, B.J. Vermeer, and B.W. Boom, *Adjuvant high-dose intravenous gammaglobulin in the treatment of pemphigus and bullous pemphigoid: experience in six patients*. Br J Dermatol, 1995. **133**(2): p. 289-93.
14. Bedane, C., J.R. McMillan, S.D. Balding, P. Bernard, C. Prost, J.M. Bonnetblanc, L.A. Diaz, R.A. Eady, and G.J. Giudice, *Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructurally separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida*. J Invest Dermatol, 1997. **108**(6): p. 901-7.
15. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.

16. Beghdadi, W., L.C. Madjene, M. Benhamou, N. Charles, G. Gautier, P. Launay, and U. Blank, *Mast cells as cellular sensors in inflammation and immunity*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 37.
17. Bernard, P., C. Prost, P. Aucouturier, N. Durepaire, F. Denis, and J.M. Bonnetblanc, *The subclass distribution of IgG autoantibodies in cicatricial pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(2): p. 259-63.
18. Bieber, K., S. Sun, N. Ishii, M. Kasperkiewicz, E. Schmidt, M. Hirose, J. Westermann, X. Yu, D. Zillikens, and R.J. Ludwig, *Animal models for autoimmune bullous dermatoses*. Exp Dermatol, 2010. **19**(1): p. 2-11.
19. Blazsek, A., P. Sillo, N. Ishii, P. Gergely, Jr., G. Poor, K. Preisz, T. Hashimoto, M. Medvecz, and S. Karpati, *Searching for foreign antigens as possible triggering factors of autoimmunity: Torque Teno virus DNA prevalence is elevated in sera of patients with bullous pemphigoid*. Exp Dermatol, 2008. **17**(5): p. 446-54.
20. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
21. Bowszyc-Dmochowska, M. and M. Dmochowski, *Immediate hypersensitivity phenomena in bullous pemphigoid: critical concepts*. J Med, 2002. **33**(1-4): p. 189-98.
22. Bredius, R.G., C.A. Fijen, M. De Haas, E.J. Kuijper, R.S. Weening, J.G. Van de Winkel, and T.A. Out, *Role of neutrophil Fc gamma RIIa (CD32) and Fc gamma RIIIb (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1- and IgG3- opsonized bacteria and erythrocytes*. Immunology, 1994. **83**(4): p. 624-30.
23. Budinger, L., L. Borradori, C. Yee, R. Eming, S. Ferencik, H. Grosse-Wilde, H.F. Merk, K. Yancey, and M. Hertl, *Identification and characterization of autoreactive T cell responses to bullous pemphigoid antigen 2 in patients and healthy controls*. J Clin Invest, 1998. **102**(12): p. 2082-9.
24. Buijsrogge, J.J., G.F. Diercks, H.H. Pas, and M.F. Jonkman, *The many faces of epidermolysis bullosa acquisita after serration pattern analysis by direct immunofluorescence microscopy*. Br J Dermatol, 2011. **165**(1): p. 92-8.
25. Bystryjn, J.C., D. Jiao, and S. Natow, *Treatment of pemphigus with intravenous immunoglobulin*. J Am Acad Dermatol, 2002. **47**(3): p. 358-63.
26. Campos, M., C. Silvente, M. Lecona, R. Suarez, and P. Lazaro, *Epidermolysis bullosa acquisita: diagnosis by fluorescence overlay antigen mapping and clinical response to high-dose intravenous immunoglobulin*. Clin Exp Dermatol, 2006. **31**(1): p. 71-3.
27. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 21-6.
28. Caux, F., [Epidermolysis bullosa acquisita]. Presse Med, 2010. **39**(10): p. 1081-8.
29. Chan, L.S., C.J. Vanderlugt, T. Hashimoto, T. Nishikawa, J.J. Zone, M.M. Black, F. Wojnarowska, S.R. Stevens, M. Chen, J.A. Fairley, D.T. Woodley, S.D. Miller, and K.B. Gordon, *Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(2): p. 103-9.
30. Chen, F., D. Pandey, A. Chadli, J.D. Catravas, T. Chen, and D.J. Fulton, *Hsp90 regulates NADPH oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(11): p. 2107-19.
31. Chen, F., Y. Yu, J. Qian, Y. Wang, B. Cheng, C. Dimitropoulou, V. Patel, A. Chadli, R.D. Rudic, D.W. Stepp, J.D. Catravas, and D.J. Fulton, *Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide*

- phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(12): p. 2989-99.
32. Chen, H., J.C. Assmann, A. Krenz, M. Rahman, M. Grimm, C.M. Karsten, J. Kohl, S. Offermanns, N. Wettschureck, and M. Schwaninger, *Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(5): p. 2188-92.
 33. Chen, L., J.D. Peterson, W.Y. Zheng, S.X. Lin, and L.S. Chan, *Autoimmunity to type VII collagen in SKH1 mice is independent of regulatory T cells*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **145**(2): p. 322-31.
 34. Chen, M., L.S. Chan, X. Cai, E.A. O'Toole, J.C. Sample, and D.T. Woodley, *Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita*. *J Invest Dermatol*, 1997. **108**(1): p. 68-72.
 35. Chen, M., A. Doostan, P. Bandyopadhyay, J. Remington, X. Wang, Y. Hou, Z. Liu, and D.T. Woodley, *The cartilage matrix protein subdomain of type VII collagen is pathogenic for epidermolysis bullosa acquisita*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(6): p. 2009-18.
 36. Chen, M., D.R. Keene, F.K. Costa, S.H. Tahk, and D.T. Woodley, *The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis Bullosa acquisita autoantibodies*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(24): p. 21649-55.
 37. Chen, M., M.P. Marinkovich, J.C. Jones, E.A. O'Toole, Y.Y. Li, and D.T. Woodley, *NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(2): p. 177-83.
 38. Chen, R., J.A. Fairley, M.L. Zhao, G.J. Giudice, D. Zillikens, L.A. Diaz, and Z. Liu, *Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation*. *J Immunol*, 2002. **169**(7): p. 3987-92.
 39. Chen, R., G. Ning, M.L. Zhao, M.G. Fleming, L.A. Diaz, Z. Werb, and Z. Liu, *Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(8): p. 1151-8.
 40. Chiriac, M.T., J. Roesler, A. Sindrilaru, K. Scharffetter-Kochanek, D. Zillikens, and C. Sitaru, *NADPH oxidase is required for neutrophil-dependent autoantibody-induced tissue damage*. *J Pathol*, 2007. **212**(1): p. 56-65.
 41. Cho, H.J., I.J. Lee, and S.C. Kim, *Complement-fixing abilities and IgG subclasses of autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita*. *Yonsei Med J*, 1998. **39**(4): p. 339-44.
 42. Chung, H.J. and J. Uitto, *Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa*. *Dermatol Clin*, 2010. **28**(1): p. 93-105.
 43. Cortes-Gonzalez, C.C., V. Ramirez-Gonzalez, A.C. Ariza, and N.A. Bobadilla, *[Functional significance of heat shock protein 90]*. *Rev Invest Clin*, 2008. **60**(4): p. 311-20.
 44. Crocker, P.R. and A. Varki, *Siglecs in the immune system*. *Immunology*, 2001. **103**(2): p. 137-45.
 45. D'Amico, E., A. Zanghi, C. Leone, H. Tumani, and F. Patti, *Treatment-Related Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Multiple Sclerosis: A*

- Comprehensive Review of Current Evidence and Future Needs*. Drug Saf, 2016. **39**(12): p. 1163-1174.
46. Dahl, M.V. and A.G. Bridges, *Intravenous immune globulin: fighting antibodies with antibodies*. J Am Acad Dermatol, 2001. **45**(5): p. 775-83.
 47. Dainichi, T., H. Koga, T. Tsuji, N. Ishii, B. Ohyama, A. Ueda, Y. Natsuaki, T. Karashima, T. Nakama, S. Yasumoto, D. Zillikens, and T. Hashimoto, *From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gamma1 pemphigoid*. J Dermatol, 2010. **37**(3): p. 231-8.
 48. de Jong, R., A.C. Bezemer, T.P. Zomerdijk, T. van de Pouw-Kraan, T.H. Ottenhoff, and P.H. Nibbering, *Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate*. Eur J Immunol, 1996. **26**(9): p. 2067-74.
 49. Delclaux, C., C. Delacourt, M.P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf, *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **14**(3): p. 288-95.
 50. Dello Russo, C., P.E. Polak, P.R. Mercado, A. Spagnolo, A. Sharp, P. Murphy, A. Kamal, F.J. Burrows, L.C. Fritz, and D.L. Feinstein, *The heat-shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin suppresses glial inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurochem, 2006. **99**(5): p. 1351-62.
 51. DeZwaan, D.C. and B.C. Freeman, *HSP90 manages the ends*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 384-91.
 52. Di Zenzo, G., F. Grosso, M. Terracina, F. Mariotti, O. De Pita, K. Owaribe, A. Mastrogiacono, F. Sera, L. Borradori, and G. Zambruno, *Characterization of the anti-BP180 autoantibody reactivity profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(1): p. 103-10.
 53. Di Zenzo, G., S. Thoma-Uszynski, V. Calabresi, L. Fontao, S.C. Hofmann, J.P. Lacour, F. Sera, L. Bruckner-Tuderman, G. Zambruno, L. Borradori, and M. Hertl, *Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(11): p. 2271-80.
 54. Diaz, L.A., H. Ratrie, 3rd, W.S. Saunders, S. Futamura, H.L. Squiquera, G.J. Anhalt, and G.J. Giudice, *Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome*. J Clin Invest, 1990. **86**(4): p. 1088-94.
 55. DiScipio, R.G. and I.U. Schraufstatter, *The role of the complement anaphylatoxins in the recruitment of eosinophils*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(14): p. 1909-23.
 56. Dopp, R., E. Schmidt, I. Chimanovitch, M. Leverkus, E.B. Brocker, and D. Zillikens, *IgG4 and IgE are the major immunoglobulins targeting the NC16A domain of BP180 in Bullous pemphigoid: serum levels of these immunoglobulins reflect disease activity*. J Am Acad Dermatol, 2000. **42**(4): p. 577-83.
 57. Dresow, S.K., C. Sitaru, A. Recke, G.J. Oostingh, D. Zillikens, and B.F. Gibbs, *IgE autoantibodies against the intracellular domain of BP180*. Br J Dermatol, 2009. **160**(2): p. 429-32.
 58. Ear, T. and P.P. McDonald, *Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF-kappaB activation in a transfectable human neutrophilic cellular model*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 14.
 59. Egan, C.A., M. Brown, J.D. White, and K.B. Yancey, *Treatment of epidermolysis bullosa acquisita with the humanized anti-Tac mAb daclizumab*. Clin Immunol, 2001. **101**(2): p. 146-51.

60. Eming, R., M. Sticherling, S.C. Hofmann, N. Hunzelmann, J.S. Kern, H. Kramer, C. Pfeiffer, V. Schuster, D. Zillikens, M. Goebeler, M. Hertl, A. Nast, H.D. Orzechowski, M. Sardy, E. Schmidt, C. Sitaru, B. Sporbeck, and M. Worm, *S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid*. J Dtsch Dermatol Ges, 2015. **13**(8): p. 833-44.
61. Engineer, L. and A.R. Ahmed, *Emerging treatment for epidermolysis bullosa acquisita*. J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(5): p. 818-28.
62. Engineer, L. and A.R. Ahmed, *Role of intravenous immunoglobulin in the treatment of bullous pemphigoid: analysis of current data*. J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(1): p. 83-8.
63. Enk, A., *Guidelines on the use of high-dose intravenous immunoglobulin in dermatology*. Eur J Dermatol, 2009. **19**(1): p. 90-8.
64. Fairley, J.A., C.T. Burnett, C.L. Fu, D.L. Larson, M.G. Fleming, and G.J. Giudice, *A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2605-11.
65. Fania, L., G. Caldarola, R. Muller, O. Brandt, R. Pellicano, C. Feliciani, and M. Hertl, *IgE recognition of bullous pemphigoid (BP)180 and BP230 in BP patients and elderly individuals with pruritic dermatoses*. Clin Immunol, 2012. **143**(3): p. 236-45.
66. Fox, R.J., D.H. Miller, J.T. Phillips, M. Hutchinson, E. Havrdova, M. Kita, M. Yang, K. Raghupathi, M. Novas, M.T. Sweetser, V. Viglietta, and K.T. Dawson, *Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2012. **367**(12): p. 1087-97.
67. French, L.E., *Toxic epidermal necrolysis and Stevens Johnson syndrome: our current understanding*. Allergol Int, 2006. **55**(1): p. 9-16.
68. Fujimoto, M. and A. Nakai, *The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress*. FEBS J, 2010. **277**(20): p. 4112-25.
69. Gammon, W.R., E.R. Heise, W.A. Burke, J.D. Fine, D.T. Woodley, and R.A. Briggaman, *Increased frequency of HLA-DR2 in patients with autoantibodies to epidermolysis bullosa acquisita antigen: evidence that the expression of autoimmunity to type VII collagen is HLA class II allele associated*. J Invest Dermatol, 1988. **91**(3): p. 228-32.
70. Gammon, W.R., D.M. Lewis, J.R. Carlo, W.M. Sams, Jr., and C.E. Wheeler, Jr., *Pemphigoid antibody mediated attachment of peripheral blood leukocytes at the dermal-epidermal junction of human skin*. J Invest Dermatol, 1980. **75**(4): p. 334-9.
71. Gandhi, K., M. Chen, S. Aasi, J.C. Lapiere, D.T. Woodley, and L.S. Chan, *Autoantibodies to type VII collagen have heterogeneous subclass and light chain compositions and their complement-activating capacities do not correlate with the inflammatory clinical phenotype*. J Clin Immunol, 2000. **20**(6): p. 416-23.
72. Garg, A. and J.P. Balthasar, *Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model to predict IgG tissue kinetics in wild-type and FcRn-knockout mice*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2007. **34**(5): p. 687-709.
73. Giudice, G.J., D.J. Emery, and L.A. Diaz, *Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(3): p. 243-50.
74. Goebeler, M., C. Sitaru, and D. Zillikens, *[Blistering autoimmune dermatoses (II): therapy]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2004. **2**(9): p. 774-91; quiz 792-3.

75. Gourgiotou, K., D. Exadaktylou, K. Aroni, E. Rallis, E. Nicolaidou, H. Paraskevovou, and A.D. Katsambas, *Epidermolysis bullosa acquisita: treatment with intravenous immunoglobulins*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2002. **16**(1): p. 77-80.
76. Groth, S., A. Recke, K. Vafia, R.J. Ludwig, T. Hashimoto, D. Zillikens, and E. Schmidt, *Development of a simple enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of autoantibodies in anti-p200 pemphigoid*. Br J Dermatol, 2011. **164**(1): p. 76-82.
77. Gunther, C., G. Wozel, M. Meurer, and C. Pfeiffer, *Up-regulation of CCL11 and CCL26 is associated with activated eosinophils in bullous pemphigoid*. Clin Exp Immunol, 2011. **166**(2): p. 145-53.
78. Gurcan, H.M. and A.R. Ahmed, *Current concepts in the treatment of epidermolysis bullosa acquisita*. Expert Opin Pharmacother, 2011. **12**(8): p. 1259-68.
79. Gurcan, H.M., S. Jeph, and A.R. Ahmed, *Intravenous immunoglobulin therapy in autoimmune mucocutaneous blistering diseases: a review of the evidence for its efficacy and safety*. Am J Clin Dermatol, 2010. **11**(5): p. 315-26.
80. Gurcan, H.M., D.B. Keskin, and A.R. Ahmed, *Information for healthcare providers on general features of IGIV with emphasis on differences between commercially available products*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(8): p. 553-9.
81. Hahn, J.S., *The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development*. BMB Rep, 2009. **42**(10): p. 623-30.
82. Hall, R.P., 3rd, J.C. Murray, M.M. McCord, M.J. Rico, and R.D. Streilein, *Rabbits immunized with a peptide encoded for by the 230-kD bullous pemphigoid antigen cDNA develop an enhanced inflammatory response to UVB irradiation: a potential animal model for bullous pemphigoid*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(1): p. 9-14.
83. Hammers, C.M., K. Bieber, K. Kalies, D. Banczyk, C.T. Ellebrecht, S.M. Ibrahim, D. Zillikens, R.J. Ludwig, and J. Westermann, *Complement-fixing anti-type VII collagen antibodies are induced in Th1-polarized lymph nodes of epidermolysis bullosa acquisita-susceptible mice*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5043-50.
84. Hao, H., Y. Naomoto, X. Bao, N. Watanabe, K. Sakurama, K. Noma, T. Motoki, Y. Tomono, T. Fukazawa, Y. Shirakawa, T. Yamatsuji, J. Matsuoka, and M. Takaoka, *HSP90 and its inhibitors*. Oncol Rep, 2010. **23**(6): p. 1483-92.
85. Harman, K.E. and M.M. Black, *High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases*. Br J Dermatol, 1999. **140**(5): p. 865-74.
86. Hashimoto, T., D. Tsuruta, T. Dainichi, T. Hamada, M. Furumura, and N. Ishii, *Demonstration of epitope spreading in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(11): p. 2175-7.
87. Hayakawa, T., K. Teye, T. Hachiya, R. Uehara, M. Hashiguchi, T. Kawakami, X. Li, A. Tsuchisaka, K. Ohara, R. Sogame, H. Koga, T. Hamada, C. Ohata, M. Furumura, N. Ishii, H. Fukano, K. Shimozato, and T. Hashimoto, *Clinical and immunological profiles of anti-BP230-type bullous pemphigoid: Restriction of epitopes to the C-terminal domain of BP230, shown by novel ELISAs of BP230-domain specific recombinant proteins*. Eur J Dermatol, 2016. **26**(2): p. 155-63.
88. Heimbach, L., Z. Li, P. Berkowitz, M. Zhao, N. Li, D.S. Rubenstein, L.A. Diaz, and Z. Liu, *The C5a receptor on mast cells is critical for the autoimmune skin-blistering disease bullous pemphigoid*. J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 15003-9.
89. Hertl, M., *Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **122**(2): p. 91-100.

90. Hertl, M., R. Eming, and C. Veldman, *T cell control in autoimmune bullous skin disorders*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1159-66.
91. Hertl, M. and G. Schuler, [*Bullous autoimmune dermatoses. 1: Classification*]. Hautarzt, 2002. **53**(3): p. 207-19; quiz 220-1.
92. Hirose, M., A. Recke, T. Beckmann, A. Shimizu, A. Ishiko, K. Bieber, J. Westermann, D. Zillikens, E. Schmidt, and R.J. Ludwig, *Repetitive immunization breaks tolerance to type XVII collagen and leads to bullous pemphigoid in mice*. J Immunol, 2011. **187**(3): p. 1176-83.
93. Hirose, M., B. Tiburzy, N. Ishii, E. Pipi, S. Wende, E. Rentz, F. Nimmerjahn, D. Zillikens, R.A. Manz, R.J. Ludwig, and M. Kasperkiewicz, *Effects of intravenous immunoglobulins on mice with experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(3): p. 768-75.
94. Hoefnagel, J.J., H.B. Thio, R. Willemze, and J.N. Bouwes Bavinck, *Long-term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis*. Br J Dermatol, 2003. **149**(2): p. 363-9.
95. Holdorf, K., *Pathogenetische Bedeutung der Fcγ-Rezeptoren und Therapieoptionen des bullösen Pemphigoids: Untersuchungen an einem ex vivo-Modell*, in *Med. Diss.* 2011, Universität zu Lübeck: Lübeck.
96. Holzbeierlein, J.M., A. Windsperger, and G. Vielhauer, *Hsp90: a drug target?* Curr Oncol Rep, 2010. **12**(2): p. 95-101.
97. Hubner, F., A. Recke, D. Zillikens, R. Linder, and E. Schmidt, *Prevalence and Age Distribution of Pemphigus and Pemphigoid Diseases in Germany*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(12): p. 2495-2498.
98. Ishii, N., T. Hamada, T. Dainichi, T. Karashima, T. Nakama, S. Yasumoto, D. Zillikens, and T. Hashimoto, *Epidermolysis bullosa acquisita: what's new?* J Dermatol, 2010. **37**(3): p. 220-30.
99. Ishii, N., A. Recke, S. Mihai, M. Hirose, T. Hashimoto, D. Zillikens, and R.J. Ludwig, *Autoantibody-induced intestinal inflammation and weight loss in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Pathol, 2011. **224**(2): p. 234-44.
100. Ishii, N., M. Yoshida, Y. Hisamatsu, A. Ishida-Yamamoto, H. Nakane, H. Iizuka, T. Tanaka, and T. Hashimoto, *Epidermolysis bullosa acquisita sera react with distinct epitopes on the NC1 and NC2 domains of type VII collagen: study using immunoblotting of domain-specific recombinant proteins and postembedding immunoelectron microscopy*. Br J Dermatol, 2004. **150**(5): p. 843-51.
101. Ishii, N., M. Yoshida, A. Ishida-Yamamoto, A. Fritsch, S. Elfert, L. Bruckner-Tuderman, and T. Hashimoto, *Some epidermolysis bullosa acquisita sera react with epitopes within the triple-helical collagenous domain as indicated by immunoelectron microscopy*. Br J Dermatol, 2009. **160**(5): p. 1090-3.
102. Ishiura, N., M. Fujimoto, R. Watanabe, H. Nakashima, Y. Kuwano, N. Yazawa, T. Echigo, H. Okochi, and K. Tamaki, *Serum levels of IgE anti-BP180 and anti-BP230 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid*. J Dermatol Sci, 2008. **49**(2): p. 153-61.
103. Iwata, H., K. Bieber, B. Tiburzy, N. Chrobok, K. Kalies, A. Shimizu, S. Leineweber, A. Ishiko, A. Vorobyev, D. Zillikens, J. Kohl, J. Westermann, K. Seeger, R. Manz, and R.J. Ludwig, *B cells, dendritic cells, and macrophages are required to induce an autoreactive CD4 helper T cell response in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Immunol, 2013. **191**(6): p. 2978-88.
104. Iwata, H., N. Kamio, Y. Aoyama, Y. Yamamoto, Y. Hirako, K. Owaribe, and Y. Kitajima, *IgG from patients with bullous pemphigoid depletes cultured*

- keratinocytes of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (type XVII collagen) and weakens cell attachment.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(4): p. 919-26.
105. Iwata, Y., K. Komura, M. Kodera, T. Usuda, Y. Yokoyama, T. Hara, E. Muroi, F. Ogawa, M. Takenaka, and S. Sato, *Correlation of IgE autoantibody to BP180 with a severe form of bullous pemphigoid.* Arch Dermatol, 2008. **144**(1): p. 41-8.
106. Jin, F. and J.P. Balthasar, *Mechanisms of intravenous immunoglobulin action in immune thrombocytopenic purpura.* Hum Immunol, 2005. **66**(4): p. 403-10.
107. Jolles, S., J. Hughes, and S. Whittaker, *Dermatological uses of high-dose intravenous immunoglobulin.* Arch Dermatol, 1998. **134**(1): p. 80-6.
108. Joly, A.L., G. Wettstein, G. Mignot, F. Ghiringhelli, and C. Garrido, *Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity.* J Innate Immun, 2010. **2**(3): p. 238-47.
109. Joly, P., J.C. Roujeau, J. Benichou, E. Delaporte, M. D'Incan, B. Dreno, C. Bedane, A. Sparsa, I. Gorin, C. Picard, E. Tancrede-Bohin, B. Sassolas, C. Lok, J.C. Guillaume, M.S. Doutre, M.A. Richard, F. Caux, C. Prost, P. Plantin, O. Chosidow, C. Pauwels, H. Maillard, P. Saiag, V. Descamps, J. Chevrant-Breton, O. Dereure, M.F. Hellot, E. Esteve, and P. Bernard, *A comparison of two regimens of topical corticosteroids in the treatment of patients with bullous pemphigoid: a multicenter randomized study.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(7): p. 1681-7.
110. Joly, P., J.C. Roujeau, J. Benichou, C. Picard, B. Dreno, E. Delaporte, L. Vaillant, M. D'Incan, P. Plantin, C. Bedane, P. Young, and P. Bernard, *A comparison of oral and topical corticosteroids in patients with bullous pemphigoid.* N Engl J Med, 2002. **346**(5): p. 321-7.
111. Jordon, R.E., S. Kawana, and K.A. Fritz, *Immunopathologic mechanisms in pemphigus and bullous pemphigoid.* J Invest Dermatol, 1985. **85**(1 Suppl): p. 72s-78s.
112. Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, and J.V. Ravetch, *Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation.* Science, 2006. **313**(5787): p. 670-3.
113. Karsten, C.M., M.K. Pandey, J. Figge, R. Kilchenstein, P.R. Taylor, M. Rosas, J.U. McDonald, S.J. Orr, M. Berger, D. Petzold, V. Blanchard, A. Winkler, C. Hess, D.M. Reid, I.V. Majoul, R.T. Strait, N.L. Harris, G. Kohl, E. Wex, R. Ludwig, D. Zillikens, F. Nimmerjahn, F.D. Finkelman, G.D. Brown, M. Ehlers, and J. Kohl, *Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1.* Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1401-6.
114. Kasperkiewicz, M., R. Muller, R. Manz, M. Magens, C.M. Hammers, C. Somlai, J. Westermann, E. Schmidt, D. Zillikens, R.J. Ludwig, and A. Orosz, *Heat-shock protein 90 inhibition in autoimmunity to type VII collagen: evidence that nonmalignant plasma cells are not therapeutic targets.* Blood, 2011. **117**(23): p. 6135-42.
115. Kasperkiewicz, M. and E. Schmidt, *Current treatment of autoimmune blistering diseases.* Curr Drug Discov Technol, 2009. **6**(4): p. 270-80.
116. Kasperkiewicz, M. and D. Zillikens, *The pathophysiology of bullous pemphigoid.* Clin Rev Allergy Immunol, 2007. **33**(1-2): p. 67-77.
117. Kasprick, A., X. Yu, J. Scholten, K. Hartmann, H.H. Pas, D. Zillikens, R.J. Ludwig, and F. Petersen, *Conditional depletion of mast cells has no impact on the severity of experimental epidermolysis bullosa acquisita.* Eur J Immunol, 2015. **45**(5): p. 1462-70.

118. Kim, J.H. and S.C. Kim, *Epidermolysis bullosa acquisita*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013. **27**(10): p. 1204-13.
119. Kim, J.H., Y.H. Kim, and S.C. Kim, *Epidermolysis bullosa acquisita: a retrospective clinical analysis of 30 cases*. Acta Derm Venereol, 2011. **91**(3): p. 307-12.
120. Kim, Y.S., S.V. Alarcon, S. Lee, M.J. Lee, G. Giaccone, L. Neckers, and J.B. Trepel, *Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial*. Curr Top Med Chem, 2009. **9**(15): p. 1479-92.
121. Kippes, W., E. Schmidt, A. Roth, B. Rzany, E.B. Brocker, and D. Zillikens, *[Immunopathologic changes in 115 patients with bullous pemphigoid]*. Hautarzt, 1999. **50**(12): p. 866-72.
122. Kiss, M., S. Husz, T. Janossy, I. Marczinovits, J. Molnar, I. Korom, and A. Dobozy, *Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230*. J Autoimmun, 2005. **24**(1): p. 1-10.
123. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 598-625.
124. Koga, H., A. Recke, G. Vidarsson, H.H. Pas, M.F. Jonkman, T. Hashimoto, A. Kasprick, S. Ghorbanalipoor, H. Tenor, D. Zillikens, and R.J. Ludwig, *PDE4 Inhibition as Potential Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(11): p. 2211-2220.
125. Kopecki, Z., R.J. Ludwig, and A.J. Cowin, *Cytoskeletal Regulation of Inflammation and Its Impact on Skin Blistering Disease Epidermolysis Bullosa Acquisita*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(7).
126. Korman, N.J., *Bullous pemphigoid. The latest in diagnosis, prognosis, and therapy*. Arch Dermatol, 1998. **134**(9): p. 1137-41.
127. Korn, T., A.C. Anderson, E. Bettelli, and M. Oukka, *The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2007. **191**(1-2): p. 51-60.
128. Kostylina, G., D. Simon, M.F. Fey, S. Yousefi, and H.U. Simon, *Neutrophil apoptosis mediated by nicotinic acid receptors (GPR109A)*. Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 134-42.
129. Kotnik, V., *Complement in skin diseases*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2011. **20**(1): p. 3-11.
130. Kozeko, L.E., *[Heat shock proteins 90 kDa: diversity, structure, functions]*. Tsitologija, 2010. **52**(11): p. 893-910.
131. Kummar, S., M.E. Gutierrez, E.R. Gardner, X. Chen, W.D. Figg, M. Zajac-Kaye, M. Chen, S.M. Steinberg, C.A. Muir, M.A. Yancey, Y.R. Horneffer, L. Juwara, G. Melillo, S.P. Ivy, M. Merino, L. Neckers, P.S. Steeg, B.A. Conley, G. Giaccone, J.H. Doroshow, and A.J. Murgo, *Phase I trial of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies*. Eur J Cancer, 2010. **46**(2): p. 340-7.
132. Labib, R.S., G.J. Anhalt, H.P. Patel, D.F. Mutasim, and L.A. Diaz, *Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting*. J Immunol, 1986. **136**(4): p. 1231-5.
133. Laffitte, E., M. Skaria, F. Jaunin, K. Tamm, J.H. Saurat, B. Favre, and L. Borradori, *Autoantibodies to the extracellular and intracellular domain of bullous pemphigoid*

- 180, the putative key autoantigen in bullous pemphigoid, belong predominantly to the IgG1 and IgG4 subclasses. *Br J Dermatol*, 2001. **144**(4): p. 760-8.
134. Langan, S.M., L. Smeeth, R. Hubbard, K.M. Fleming, C.J. Smith, and J. West, *Bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris--incidence and mortality in the UK: population based cohort study*. *BMJ*, 2008. **337**: p. a180.
135. Lapiere, J.C., D.T. Woodley, M.G. Parente, T. Iwasaki, K.C. Wynn, A.M. Christiano, and J. Uitto, *Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(4): p. 1831-9.
136. Le Cabec, V., J.B. Cowland, J. Calafat, and N. Borregaard, *Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(13): p. 6454-7.
137. Le Roux-Villet, C. and C. Prost-Squarcioni, *[Epidermolysis bullosa acquisita: literature review]*. *Ann Dermatol Venereol*, 2011. **138**(3): p. 228-46.
138. Leighty, L., N. Li, L.A. Diaz, and Z. Liu, *Experimental models for the autoimmune and inflammatory blistering disease, Bullous pemphigoid*. *Arch Dermatol Res*, 2007. **299**(9): p. 417-22.
139. Lever, W.F., *Pemphigus*. *Medicine (Baltimore)*, 1953. **32**(1): p. 1-123.
140. Li, K.H., D. Sawamura, G.J. Giudice, L.A. Diaz, M.G. Mattei, M.L. Chu, and J. Uitto, *Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kDa bullous pemphigoid antigen-2, a novel collagen of stratified squamous epithelium*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(35): p. 24064-9.
141. Li, N., M. Zhao, J. Hilario-Vargas, P. Prisyanyh, S. Warren, L.A. Diaz, D.C. Roopenian, and Z. Liu, *Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3440-50.
142. Li, Q., H. Ujiie, A. Shibaki, G. Wang, R. Moriuchi, H.J. Qiao, H. Morioka, S. Shinkuma, K. Natsuga, H.A. Long, W. Nishie, and H. Shimizu, *Human IgG1 monoclonal antibody against human collagen 17 noncollagenous 16A domain induces blisters via complement activation in experimental bullous pemphigoid model*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7746-55.
143. Lin, F., C.M. Nguyen, S.J. Wang, W. Saadi, S.P. Gross, and N.L. Jeon, *Effective neutrophil chemotaxis is strongly influenced by mean IL-8 concentration*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **319**(2): p. 576-81.
144. Lin, L., T. Betsuyaku, L. Heimbach, N. Li, D. Rubenstein, S.D. Shapiro, L. An, G.J. Giudice, L.A. Diaz, R.M. Senior, and Z. Liu, *Neutrophil elastase cleaves the murine hemidesmosomal protein BP180/type XVII collagen and generates degradation products that modulate experimental bullous pemphigoid*. *Matrix Biol*, 2011.
145. Lin, M.S., C.L. Fu, G.J. Giudice, M. Olague-Marchan, A.M. Lazaro, P. Stastny, and L.A. Diaz, *Epitopes targeted by bullous pemphigoid T lymphocytes and autoantibodies map to the same sites on the bullous pemphigoid 180 ectodomain*. *J Invest Dermatol*, 2000. **115**(6): p. 955-61.
146. Linker, R.A. and A. Haghikia, *Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence and place in therapy*. *Ther Adv Chronic Dis*, 2016. **7**(4): p. 198-207.
147. Litjens, N.H., E. van Strijen, C. van Gulpen, H. Mattie, J.T. van Dissel, H.B. Thio, and P.H. Nibbering, *In vitro pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters*. *BMC Pharmacol*, 2004. **4**: p. 22.

148. Liu, Z., *Immunopathology of bullous pemphigoid, an autoimmune and inflammatory skin blistering disease*. Keio J Med, 2003. **52**(2): p. 128-33.
149. Liu, Z., L.A. Diaz, J.L. Troy, A.F. Taylor, D.J. Emery, J.A. Fairley, and G.J. Giudice, *A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180*. J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2480-8.
150. Liu, Z., G.J. Giudice, X. Zhou, S.J. Swartz, J.L. Troy, J.A. Fairley, G.O. Till, and L.A. Diaz, *A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1256-63.
151. Liu, Z., N. Li, L.A. Diaz, M. Shipley, R.M. Senior, and Z. Werb, *Synergy between a plasminogen cascade and MMP-9 in autoimmune disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 879-87.
152. Liu, Z., S.D. Shapiro, X. Zhou, S.S. Twining, R.M. Senior, G.J. Giudice, J.A. Fairley, and L.A. Diaz, *A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid*. J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 113-23.
153. Liu, Z., J.M. Shipley, T.H. Vu, X. Zhou, L.A. Diaz, Z. Werb, and R.M. Senior, *Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid*. J Exp Med, 1998. **188**(3): p. 475-82.
154. Loewe, R., W. Holnthoner, M. Groger, M. Pillinger, F. Gruber, D. Mechtcheriakova, E. Hofer, K. Wolff, and P. Petzelbauer, *Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4781-7.
155. Loewe, R., M. Pillinger, R. de Martin, U. Mrowietz, M. Groger, W. Holnthoner, K. Wolff, W. Wiegrebe, D. Jirovsky, and P. Petzelbauer, *Dimethylfumarate inhibits tumor-necrosis-factor-induced CD62E expression in an NF-kappa B-dependent manner*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(6): p. 1363-8.
156. Ludwig, R., *Immune mechanism-targeted treatment of experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Expert Rev Clin Immunol, 2015. **11**(12): p. 1365-78.
157. Ludwig, R.J., *Clinical presentation, pathogenesis, diagnosis, and treatment of epidermolysis bullosa acquisita*. ISRN Dermatol, 2013. **2013**: p. 812029.
158. Ludwig, R.J., K. Vanhoorelbeke, F. Leypoldt, Z. Kaya, K. Bieber, S.M. McLachlan, L. Komorowski, J. Luo, O. Cabral-Marques, C.M. Hammers, J.M. Lindstrom, P. Lamprecht, A. Fischer, G. Riemekasten, C. Tersteeg, P. Sondermann, B. Rapoport, K.P. Wandinger, C. Probst, A. El Beidaq, E. Schmidt, A. Verkman, R.A. Manz, and F. Nimmerjahn, *Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 603.
159. Ludwig, R.J. and D. Zillikens, *Pathogenesis of epidermolysis bullosa acquisita*. Dermatol Clin, 2011. **29**(3): p. 493-501, xi.
160. Luo, C.Q., C.Q. Yin, J.D. Zhou, Q.Y. He, J. Zhu, P. Li, T.F. Chen, H. Peng, Y.C. Xu, and J. Chen, *[Influence of heat shock factor 1 gene transfection on the expression of inflammatory mediators in macrophages induced by burn serum]*. Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2007. **23**(5): p. 331-4.
161. Luo, W., W. Sun, T. Taldone, A. Rodina, and G. Chiosis, *Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases*. Mol Neurodegener, 2010. **5**: p. 24.
162. Madrigal-Matute, J., O. Lopez-Franco, L.M. Blanco-Colio, B. Munoz-Garcia, P. Ramos-Mozo, L. Ortega, J. Egido, and J.L. Martin-Ventura, *Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 330-7.

163. Masunaga, T., H. Shimizu, C. Yee, L. Borradori, Z. Lazarova, T. Nishikawa, and K.B. Yancey, *The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane*. J Invest Dermatol, 1997. **109**(2): p. 200-6.
164. Matsumura, K., M. Amagai, T. Nishikawa, and T. Hashimoto, *The majority of bullous pemphigoid and herpes gestationis serum samples react with the NC16a domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(9): p. 507-9.
165. Matts, R.L. and J.R. Manjarrez, *Assays for identification of Hsp90 inhibitors and biochemical methods for discriminating their mechanism of action*. Curr Top Med Chem, 2009. **9**(15): p. 1462-78.
166. McMillan, J.R., T. Matsumura, T. Hashimoto, H. Schumann, L. Bruckner-Tuderman, and H. Shimizu, *Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa*. Exp Dermatol, 2003. **12**(3): p. 261-7.
167. Meissner, M., E.M. Valesky, S. Kippenberger, and R. Kaufmann, *Dimethyl fumarate - only an anti-psoriatic medication?* J Dtsch Dermatol Ges, 2012. **10**(11): p. 793-801.
168. Messingham, K.N., T.A. Pietras, and J.A. Fairley, *Role of IgE in bullous pemphigoid: a review and rationale for IgE directed therapies*. G Ital Dermatol Venereol, 2012. **147**(3): p. 251-7.
169. Messingham, K.N., R. Srikantha, A.M. DeGueme, and J.A. Fairley, *FcR-independent effects of IgE and IgG autoantibodies in bullous pemphigoid*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 553-60.
170. Michels, H., G.R. Burmester, and F. Buttgereit, *[Intravenous immunoglobulins in chronic idiopathic myositis]*. Z Rheumatol, 2005. **64**(2): p. 102-10.
171. Mihai, S., M.T. Chiriac, K. Takahashi, J.M. Thurman, V.M. Holers, D. Zillikens, M. Botto, and C. Sitaru, *The alternative pathway of complement activation is critical for blister induction in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6514-21.
172. Miller, A.C., J. Gafner, E.P. Clark, and D. Samid, *Posttranscriptional down-regulation of ras oncogene expression by inhibitors of cellular glutathione*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 4416-22.
173. Moller, A., U. Lippert, D. Lessmann, G. Kolde, K. Hamann, P. Welker, D. Schadendorf, T. Rosenbach, T. Luger, and B.M. Czarnetzki, *Human mast cells produce IL-8*. J Immunol, 1993. **151**(6): p. 3261-6.
174. Morel, P. and J.C. Guillaume, *[Treatment of bullous pemphigoid with prednisolone only: 0.75 mg/kg/day versus 1.25 mg/kg/day. A multicenter randomized study]*. Ann Dermatol Venereol, 1984. **111**(10): p. 925-8.
175. Morris, G., G. Anderson, O. Dean, M. Berk, P. Galecki, M. Martin-Subero, and M. Maes, *The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders*. Mol Neurobiol, 2014. **50**(3): p. 1059-84.
176. Mrowietz, U. and K. Asadullah, *Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity*. Trends Mol Med, 2005. **11**(1): p. 43-8.
177. Mrowietz, U., E. Christophers, and P. Altmeyer, *Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study. German Multicentre Study*. Br J Dermatol, 1998. **138**(3): p. 456-60.
178. Mrowietz, U. and K. Reich, *Psoriasis--new insights into pathogenesis and treatment*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(1-2): p. 11-8, quiz 19.

179. Mueller, S., V. Klaus-Kovtun, and J.R. Stanley, *A 230-kD basic protein is the major bullous pemphigoid antigen*. J Invest Dermatol, 1989. **92**(1): p. 33-8.
180. Muller, R., C. Dahler, C. Mobs, E. Wenzel, R. Eming, G. Messer, A. Niedermeier, and M. Hertl, *T and B cells target identical regions of the non-collagenous domain 1 of type VII collagen in epidermolysis bullosa acquisita*. Clin Immunol, 2010. **135**(1): p. 99-107.
181. Muller, S., M. Behnen, K. Bieber, S. Moller, L. Hellberg, M. Witte, M. Hansel, D. Zillikens, W. Solbach, T. Laskay, and R.J. Ludwig, *Dimethylfumarate Impairs Neutrophil Functions*. J Invest Dermatol, 2015.
182. Munoz, N.M. and A.R. Leff, *Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2613-20.
183. Nagata, M., *Inflammatory cells and oxygen radicals*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(4): p. 503-4.
184. Nakatani, C., T. Muramatsu, and T. Shirai, *Immunoreactivity of bullous pemphigoid (BP) autoantibodies against the NC16A and C-terminal domains of the 180 kDa BP antigen (BP180): immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using BP180 recombinant proteins*. Br J Dermatol, 1998. **139**(3): p. 365-70.
185. Nast, A., W.H. Boehncke, U. Mrowietz, H.M. Ockenfels, S. Philipp, K. Reich, T. Rosenbach, A. Sammain, M. Schlaeger, M. Sebastian, W. Sterry, V. Streit, M. Augustin, R. Erdmann, J. Klaus, J. Koza, S. Muller, H.D. Orzechowski, S. Rosumeck, G. Schmid-Ott, T. Weberschock, and B. Rzany, *[S3-guidelines for the treatment of psoriasis vulgaris Update 2011]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2011. **9 Suppl 2**: p. S1-104.
186. Natsuga, K., W. Nishie, S. Shinkuma, H. Ujiie, M. Nishimura, D. Sawamura, and H. Shimizu, *Antibodies to pathogenic epitopes on type XVII collagen cause skin fragility in a complement-dependent and -independent manner*. J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5792-9.
187. Nelson, K.C., J.L. Carlson, M.L. Newman, P. Sternberg, Jr., D.P. Jones, T.J. Kavanagh, D. Diaz, J. Cai, and M. Wu, *Effect of dietary inducer dimethylfumarate on glutathione in cultured human retinal pigment epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(9): p. 1927-35.
188. Nelson, K.C., M. Zhao, P.R. Schroeder, N. Li, R.A. Wetsel, L.A. Diaz, and Z. Liu, *Role of different pathways of the complement cascade in experimental bullous pemphigoid*. J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 2892-900.
189. Nibbering, P.H., B. Thio, T.P. Zomerdiik, A.C. Bezemer, R.L. Beijersbergen, and R. van Furth, *Effects of monomethylfumarate on human granulocytes*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(1): p. 37-42.
190. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 11-5.
191. Nishie, W., *Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII*. J Dermatol Sci, 2014. **73**(3): p. 179-86.
192. Nishie, W., S. Lamer, A. Schlosser, E. Licarete, C.W. Franzke, S.C. Hofmann, J. Jackow, C. Sitaru, and L. Bruckner-Tuderman, *Ectodomain shedding generates Neoepitopes on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4938-47.

193. Nishie, W., D. Sawamura, M. Goto, K. Ito, A. Shibaki, J.R. McMillan, K. Sakai, H. Nakamura, E. Olasz, K.B. Yancey, M. Akiyama, and H. Shimizu, *Humanization of autoantigen*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 378-83.
194. Nugteren-Huying, W.M., J.G. van der Schroeff, J. Hermans, and D. Suurmond, [*Fumaric acid therapy in psoriasis; a double-blind, placebo-controlled study*]. Ned Tijdschr Geneeskd, 1990. **134**(49): p. 2387-91.
195. Okazaki, A., S. Miyagawa, Y. Yamashina, W. Kitamura, and T. Shirai, *Polymorphisms of HLA-DR and -DQ genes in Japanese patients with bullous pemphigoid*. J Dermatol, 2000. **27**(3): p. 149-56.
196. Oktem, A., B.N. Akay, A. Boyvat, N. Kundakci, C. Erdem, S. Bostanci, H. Sanli, and P. Kocyigit, *Long-term results of rituximab-intravenous immunoglobulin combination therapy in patients with epidermolysis bullosa acquisita resistant to conventional therapy*. J Dermatolog Treat, 2016: p. 1-5.
197. Otten, J.V., T. Hashimoto, M. Hertl, A.S. Payne, and C. Sitaru, *Molecular diagnosis in autoimmune skin blistering conditions*. Curr Mol Med, 2014. **14**(1): p. 69-95.
198. Pacey, S., R.H. Wilson, M. Walton, M.M. Eatock, A. Hardcastle, A. Zetterlund, H.T. Arkenau, J. Moreno-Farre, U. Banerji, B. Roels, H. Peachey, W. Aherne, J.S. de Bono, F. Raynaud, P. Workman, and I. Judson, *A phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (17-DMAG) given intravenously to patients with advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(6): p. 1561-70.
199. Papadopoulou, A., M. D'Souza, L. Kappos, and O. Yaldizli, *Dimethyl fumarate for multiple sclerosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(12): p. 1603-12.
200. Pender, M.P., *CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis*. Autoimmune Dis, 2012. **2012**: p. 189096.
201. Peng, H., M. Guerau-de-Arellano, V.B. Mehta, Y. Yang, D.J. Huss, T.L. Papenfuss, A.E. Lovett-Racke, and M.K. Racke, *Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(33): p. 28017-26.
202. Perriard, J., F. Jaunin, B. Favre, L. Budinger, M. Hertl, J.H. Saurat, and L. Borradori, *IgG autoantibodies from bullous pemphigoid (BP) patients bind antigenic sites on both the extracellular and the intracellular domains of the BP antigen 180*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(2): p. 141-7.
203. Pratt, W.B., F.C. Dalman, S. Meshinchi, and L.C. Scherrer, *The relationship between glucocorticoid receptor binding to Hsp90 and receptor function*. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1990. **66**(12): p. 1185-97.
204. Rada, B. and T.L. Leto, *Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 164-87.
205. Raghavan, M. and P.J. Bjorkman, *Fc receptors and their interactions with immunoglobulins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 181-220.
206. Ramanathan, R.K., M.J. Egorin, C. Erlichman, S.C. Remick, S.S. Ramalingam, C. Naret, J.L. Holleran, C.J. TenEyck, S.P. Ivy, and C.P. Belani, *Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, an inhibitor of heat-shock protein 90, in patients with advanced solid tumors*. J Clin Oncol, 2010. **28**(9): p. 1520-6.

207. Reddy, H., A.R. Shipman, and F. Wojnarowska, *Epidermolysis bullosa acquisita and inflammatory bowel disease: a review of the literature*. Clin Exp Dermatol, 2013. **38**(3): p. 225-9; quiz 229-30.
208. Rostami-Yazdi, M., B. Clement, and U. Mrowietz, *Pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters in psoriasis patients*. Arch Dermatol Res, 2010. **302**(7): p. 531-8.
209. Rostami-Yazdi, M., B. Clement, T.J. Schmidt, D. Schinor, and U. Mrowietz, *Detection of metabolites of fumaric acid esters in human urine: implications for their mode of action*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 231-4.
210. Rostami Yazdi, M. and U. Mrowietz, *Fumaric acid esters*. Clin Dermatol, 2008. **26**(5): p. 522-6.
211. Rubant, S.A., R.J. Ludwig, S. Diehl, K. Hardt, R. Kaufmann, J.M. Pfeilschifter, and W.H. Boehncke, *Dimethylfumarate reduces leukocyte rolling in vivo through modulation of adhesion molecule expression*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(2): p. 326-31.
212. Ruiz-Arguelles, A., L. Rivadeneyra-Espinoza, and D. Alarcon-Segovia, *Antibody penetration into living cells: pathogenic, preventive and immuno-therapeutic implications*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(23): p. 1881-7.
213. Sawamura, D., K. Li, M.L. Chu, and J. Uitto, *Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 17784-90.
214. Schmidt, E., *[Optimizing therapy in patients with severe autoimmune blistering skin diseases]*. Hautarzt, 2009. **60**(8): p. 633-40.
215. Schmidt, E., B. Bastian, R. Dummer, H.P. Tony, E.B. Brocker, and D. Zillikens, *Detection of elevated levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid*. Arch Dermatol Res, 1996. **288**(7): p. 353-7.
216. Schmidt, E., E.B. Brocker, and D. Zillikens, *High levels of soluble CD23 in blister fluid of patients with bullous pemphigoid*. Arch Dermatol, 1995. **131**(8): p. 966-7.
217. Schmidt, E., E.B. Brocker, and D. Zillikens, *[New aspects on the pathogenesis of bullous pemphigoid]*. Hautarzt, 2000. **51**(9): p. 637-45.
218. Schmidt, E., K. Obe, E.B. Brocker, and D. Zillikens, *Serum levels of autoantibodies to BP180 correlate with disease activity in patients with bullous pemphigoid*. Arch Dermatol, 2000. **136**(2): p. 174-8.
219. Schmidt, E., S. Reimer, N. Kruse, S. Jainta, E.B. Brocker, M.P. Marinkovich, G.J. Giudice, and D. Zillikens, *Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(5): p. 842-8.
220. Schmidt, E. and D. Zillikens, *The diagnosis and treatment of autoimmune blistering skin diseases*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(23): p. 399-405.
221. Schmidt, T.J., M. Ak, and U. Mrowietz, *Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-L-cysteine--preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(1): p. 333-42.
222. Schroder, A.K., M. von der Ohe, U. Kolling, J. Altstaedt, P. Uciechowski, D. Fleischer, K. Dalhoff, X. Ju, M. Zenke, N. Heussen, and L. Rink, *Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators*. Immunology, 2006. **119**(3): p. 317-27.

223. Sesarman, A., S. Mihai, M.T. Chiriac, F. Olaru, A.G. Sitaru, J.M. Thurman, D. Zillikens, and C. Sitaru, *Binding of avian IgY to type VII collagen does not activate complement and leucocytes and fails to induce subepidermal blistering in mice*. Br J Dermatol, 2008. **158**(3): p. 463-71.
224. Shimanovich, I., S. Mihai, G.J. Oostingh, T.T. Ilenchuk, E.B. Brocker, G. Opdenakker, D. Zillikens, and C. Sitaru, *Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 519-27.
225. Shimanovich, I., C. Rose, Y. Hirako, E. Butt-Dorje, and D. Zillikens, *[Anti-p200 pemphigoid--a new bullous autoimmune dermatosis]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2004. **2**(1): p. 7-14.
226. Shimp, S.K., 3rd, C.D. Parson, N.L. Regna, A.N. Thomas, C.B. Chafin, C.M. Reilly, and M. Nichole Rylander, *HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor-kappaB pathways*. Inflamm Res, 2012. **61**(5): p. 521-33.
227. Sitaru, A.G., A. Sesarman, S. Mihai, M.T. Chiriac, D. Zillikens, P. Hultman, W. Solbach, and C. Sitaru, *T cells are required for the production of blister-inducing autoantibodies in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1596-603.
228. Sitaru, C., *Bullous pemphigoid: a prototypical antibody-mediated organ-specific autoimmune disease*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(4): p. 822-4.
229. Sitaru, C., *Experimental models of epidermolysis bullosa acquisita*. Exp Dermatol, 2007. **16**(6): p. 520-31.
230. Sitaru, C., M.T. Chiriac, S. Mihai, J. Buning, A. Gebert, A. Ishiko, and D. Zillikens, *Induction of complement-fixing autoantibodies against type VII collagen results in subepidermal blistering in mice*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3461-8.
231. Sitaru, C., M. Goebeler, and D. Zillikens, *[Bullous autoimmune dermatoses (I): Pathogenesis and diagnosis]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2004. **2**(2): p. 123-8; quiz 139-40.
232. Sitaru, C., A. Kromminga, T. Hashimoto, E.B. Brocker, and D. Zillikens, *Autoantibodies to type VII collagen mediate Fc-gamma-dependent neutrophil activation and induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 301-11.
233. Sitaru, C., S. Mihai, C. Otto, M.T. Chiriac, I. Hausser, B. Dotterweich, H. Saito, C. Rose, A. Ishiko, and D. Zillikens, *Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 870-8.
234. Sitaru, C., E. Schmidt, S. Petermann, L.S. Munteanu, E.B. Brocker, and D. Zillikens, *Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): p. 664-71.
235. Skaria, M., F. Jaunin, T. Hunziker, S. Riou, H. Schumann, L. Bruckner-Tuderman, M. Hertl, P. Bernard, J.H. Saurat, B. Favre, and L. Borradori, *IgG autoantibodies from bullous pemphigoid patients recognize multiple antigenic reactive sites located predominantly within the B and C subdomains of the COOH-terminus of BP230*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(5): p. 998-1004.
236. Smith, V., E.A. Sausville, R.F. Camalier, H.H. Fiebig, and A.M. Burger, *Comparison of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin*

- (17DMAG) and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) *in vitro*: effects on Hsp90 and client proteins in melanoma models. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. **56**(2): p. 126-37.
237. Spencer, S.R., C.A. Wilczak, and P. Talalay, *Induction of glutathione transferases and NAD(P)H:quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues*. *Cancer Res*, 1990. **50**(24): p. 7871-5.
238. Stahle-Backdahl, M., M. Inoue, G.J. Guidice, and W.C. Parks, *92-kD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-kD bullous pemphigoid autoantigen*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 2022-30.
239. Stanley, J.R., P. Hawley-Nelson, S.H. Yuspa, E.M. Shevach, and S.I. Katz, *Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia*. *Cell*, 1981. **24**(3): p. 897-903.
240. Stanley, J.R., T. Tanaka, S. Mueller, V. Klaus-Kovtun, and D. Roop, *Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(6): p. 1864-70.
241. Tanaka, H., A. Ishida-Yamamoto, T. Hashimoto, K. Hiramoto, T. Harada, Y. Kawachi, H. Shimizu, T. Tanaka, K. Kishiyama, B. Hopfner, H. Takahashi, H. Iizuka, and L. Bruckner-Tuderman, *A novel variant of acquired epidermolysis bullosa with autoantibodies against the central triple-helical domain of type VII collagen*. *Lab Invest*, 1997. **77**(6): p. 623-32.
242. Tanaka, K., T. Namba, Y. Arai, M. Fujimoto, H. Adachi, G. Sobue, K. Takeuchi, A. Nakai, and T. Mizushima, *Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(32): p. 23240-52.
243. Tanaka, T., F. Furukawa, and S. Imamura, *Epitope mapping for epidermolysis bullosa acquisita autoantibody by molecularly cloned cDNA for type VII collagen*. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**(5): p. 706-9.
244. Tanaka, T., D.A. Parry, V. Klaus-Kovtun, P.M. Steinert, and J.R. Stanley, *Comparison of molecularly cloned bullous pemphigoid antigen to desmoplakin I confirms that they define a new family of cell adhesion junction plaque proteins*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(19): p. 12555-9.
245. Tang, H., J.Y. Lu, X. Zheng, Y. Yang, and J.D. Reagan, *The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **375**(4): p. 562-5.
246. Thakur, M.K., L.K. Heilbrun, S. Sheng, M. Stein, G. Liu, E.S. Antonarakis, U. Vaishampayan, S.H. Dzinic, X. Li, S. Freeman, D. Smith, and E.I. Heath, *A phase II trial of ganetespib, a heat shock protein 90 Hsp90) inhibitor, in patients with docetaxel-pretreated metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC)-a prostate cancer clinical trials consortium (PCCTC) study*. *Invest New Drugs*, 2016. **34**(1): p. 112-8.
247. Thoma-Uszynski, S., W. Uter, S. Schwietzke, S.C. Hofmann, T. Hunziker, P. Bernard, R. Treudler, C.C. Zouboulis, G. Schuler, L. Borradori, and M. Hertl, *BP230- and BP180-specific auto-antibodies in bullous pemphigoid*. *J Invest Dermatol*, 2004. **122**(6): p. 1413-22.
248. Thoma-Uszynski, S., W. Uter, S. Schwietzke, G. Schuler, L. Borradori, and M. Hertl, *Autoreactive T and B cells from bullous pemphigoid (BP) patients recognize epitopes clustered in distinct regions of BP180 and BP230*. *J Immunol*, 2006. **176**(3): p. 2015-23.

249. Treumer, F., K. Zhu, R. Glaser, and U. Mrowietz, *Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(6): p. 1383-8.
250. Tukaj, S., K. Bieber, K. Kleszczynski, M. Witte, R. Cames, K. Kalies, D. Zillikens, R.J. Ludwig, T.W. Fischer, and M. Kasperkiewicz, *Topically Applied Hsp90 Blocker 17AAG Inhibits Autoantibody-Mediated Blister-Inducing Cutaneous Inflammation*. J Invest Dermatol, 2016.
251. Tukaj, S., D. Gruner, D. Zillikens, and M. Kasperkiewicz, *Hsp90 blockade modulates bullous pemphigoid IgG-induced IL-8 production by keratinocytes*. Cell Stress Chaperones, 2014. **19**(6): p. 887-94.
252. Tukaj, S., L. Hellberg, C. Ueck, M. Hansel, U. Samavedam, D. Zillikens, R.J. Ludwig, T. Laskay, and M. Kasperkiewicz, *Heat shock protein 90 is required for ex vivo neutrophil-driven autoantibody-induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita*. Exp Dermatol, 2015. **24**(6): p. 471-3.
253. Tukaj, S., K. Kleszczynski, K. Vafia, S. Groth, D. Meyersburg, P. Trzonkowski, R.J. Ludwig, D. Zillikens, E. Schmidt, T.W. Fischer, and M. Kasperkiewicz, *Aberrant expression and secretion of heat shock protein 90 in patients with bullous pemphigoid*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70496.
254. Tukaj, S., D. Zillikens, and M. Kasperkiewicz, *Heat shock protein 90: a pathophysiological factor and novel treatment target in autoimmune bullous skin diseases*. Exp Dermatol, 2015. **24**(8): p. 567-71.
255. Ujiie, H., A. Shibaki, W. Nishie, and H. Shimizu, *What's new in bullous pemphigoid*. J Dermatol, 2010. **37**(3): p. 194-204.
256. Ujiie, H., A. Shibaki, W. Nishie, S. Shinkuma, R. Moriuchi, H. Qiao, and H. Shimizu, *Noncollagenous 16A domain of type XVII collagen-reactive CD4+ T cells play a pivotal role in the development of active disease in experimental bullous pemphigoid model*. Clin Immunol, 2012. **142**(2): p. 167-75.
257. Vanderlugt, C.J. and S.D. Miller, *Epitope spreading*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(6): p. 831-6.
258. Vandermeeren, M., S. Janssens, H. Wouters, I. Borghmans, M. Borgers, R. Beyaert, and J. Geysen, *Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B1, but not RelA in normal human dermal fibroblast cells*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(1): p. 124-30.
259. Venning, V.A., K. Taghipour, M.F. Mohd Mustapa, A.S. Highet, and G. Kirtschig, *British Association of Dermatologists' guidelines for the management of bullous pemphigoid 2012*. Br J Dermatol, 2012. **167**(6): p. 1200-14.
260. Verkhivker, G.M., A. Dixit, G. Morra, and G. Colombo, *Structural and computational biology of the molecular chaperone Hsp90: from understanding molecular mechanisms to computer-based inhibitor design*. Curr Top Med Chem, 2009. **9**(15): p. 1369-85.
261. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 181-213.
262. Vidarsson, G., A.M. Stemerding, N.M. Stapleton, S.E. Splethoff, H. Janssen, F.E. Rebers, M. de Haas, and J.G. van de Winkel, *FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3573-9.
263. Vorobyev, A., H. Ujiie, A. Recke, J.J. Buijsrogge, M.F. Jonkman, H.H. Pas, H. Iwata, T. Hashimoto, S.C. Kim, J. Hoon Kim, R. Groves, U. Samavedam, Y. Gupta, E. Schmidt, D. Zillikens, H. Shimizu, and R.J. Ludwig, *Autoantibodies to Multiple Epitopes on the Non-Collagenous-1 Domain of Type VII Collagen Induce Blisters*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(6): p. 1565-73.

264. Washburn, N., I. Schwab, D. Ortiz, N. Bhatnagar, J.C. Lansing, A. Medeiros, S. Tyler, D. Mekala, E. Cochran, H. Sarvaiya, K. Garofalo, R. Meccariello, J.W. Meador, 3rd, L. Rutitzky, B.C. Schultes, L. Ling, W. Avery, F. Nimmerjahn, A.M. Manning, G.V. Kaundinya, and C.J. Bosques, *Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(11): p. E1297-306.
265. Weisenseel, P., S. Martin, K. Partscht, G. Messer, and J.C. Prinz, *Relevance of the low-affinity type of the Fcγ-receptor IIIa-polymorphism in bullous pemphigoid*. Arch Dermatol Res, 2007. **299**(3): p. 163-4.
266. Wilms, H., J. Sievers, U. Rickert, M. Rostami-Yazdi, U. Mrowietz, and R. Lucius, *Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1β, TNF-α and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 30.
267. Wirth, D., F. Bureau, D. Melotte, E. Christians, and P. Gustin, *Evidence for a role of heat shock factor 1 in inhibition of NF-κB pathway during heat shock response-mediated lung protection*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(5): p. L953-61.
268. Woodley, D.T., C. Chang, P. Saadat, R. Ram, Z. Liu, and M. Chen, *Evidence that anti-type VII collagen antibodies are pathogenic and responsible for the clinical, histological, and immunological features of epidermolysis bullosa acquisita*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(5): p. 958-64.
269. Woodley, D.T., R. Ram, A. Doostan, P. Bandyopadhyay, Y. Huang, J. Remington, Y. Hou, D.R. Keene, Z. Liu, and M. Chen, *Induction of epidermolysis bullosa acquisita in mice by passive transfer of autoantibodies from patients*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(6): p. 1323-30.
270. Yalcin, A.D., G.E. Genc, B. Celik, and S. Gumuslu, *Anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) is effective in treating bullous pemphigoid and its effects on soluble CD200*. Clin Lab, 2014. **60**(3): p. 523-4.
271. Yancey, K.B., *The pathophysiology of autoimmune blistering diseases*. J Clin Invest, 2005. **115**(4): p. 825-8.
272. Yu, K.K., A.B. Crew, K.A. Messingham, J.A. Fairley, and D.T. Woodley, *Omalizumab therapy for bullous pemphigoid*. J Am Acad Dermatol, 2014. **71**(3): p. 468-74.
273. Yu, X., K. Holdorf, B. Kasper, D. Zillikens, R.J. Ludwig, and F. Petersen, *FcγRIIA and FcγRIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(12): p. 2841-4.
274. Yun, T.J., E.K. Harning, K. Giza, D. Rabah, P. Li, J.W. Arndt, D. Luchetti, M.A. Biamonte, J. Shi, K. Lundgren, A. Manning, and M.R. Kehry, *EC144, a synthetic inhibitor of heat shock protein 90, blocks innate and adaptive immune responses in models of inflammation and autoimmunity*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 563-75.
275. Zakka, L.R., P. Reche, and A.R. Ahmed, *Role of MHC Class II genes in the pathogenesis of pemphigoid*. Autoimmun Rev, 2011. **11**(1): p. 40-7.
276. Zhao, M., M.E. Trimbeger, N. Li, L.A. Diaz, S.D. Shapiro, and Z. Liu, *Role of FcRs in animal model of autoimmune bullous pemphigoid*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3398-405.
277. Zhu, K. and U. Mrowietz, *Enhancement of antibacterial superoxide-anion generation in human monocytes by fumaric acid esters*. Arch Dermatol Res, 2005. **297**(4): p. 170-6.

-
278. Zhu, X., G. Meng, B.L. Dickinson, X. Li, E. Mizoguchi, L. Miao, Y. Wang, C. Robert, B. Wu, P.D. Smith, W.I. Lencer, and R.S. Blumberg, *MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3266-76.
 279. Zillikens, D., J.M. Mascaro, P.A. Rose, Z. Liu, S.M. Ewing, F. Caux, R.G. Hoffmann, L.A. Diaz, and G.J. Giudice, *A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP180 autoantibodies in patients with bullous pemphigoid*. J Invest Dermatol, 1997. **109**(5): p. 679-83.
 280. Zillikens, D., P.A. Rose, S.D. Balding, Z. Liu, M. Olague-Marchan, L.A. Diaz, and G.J. Giudice, *Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies*. J Invest Dermatol, 1997. **109**(4): p. 573-9.
 281. Zone, J.J., T. Taylor, C. Hull, L. Schmidt, and L. Meyer, *IgE basement membrane zone antibodies induce eosinophil infiltration and histological blisters in engrafted human skin on SCID mice*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(5): p. 1167-74.

7 Anhänge



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Cassian Sitaru
Klinik für Dermatologie und Venerologie
im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500-4639
Fax: (0451) 500-3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

nachrichtlich:
Herrn Prof. Zillikens
Direktor der Klinik für Dermatologie und Venerologie

Datum: 11.05.2004
Aktenzeichen: **04-061**
(immer angeben!)

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission vom 23. April 2004

Antragsteller: Herr Dr. Sitaru / Herr Prof. Zillikens

Titel: Autoimmunität gegen Strukturproteine der Haut bei blasenbildenden Autoimmundermatosen

Sehr geehrter Herr Dr. Sitaru,

Ihre Studie wurde zur Kenntnis genommen und von mir geprüft. Da sie bereits von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg geprüft und positiv beurteilt wurde, wird auf eine weitere Beratung verzichtet.

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck schließt sich dem vorhandenen Votum vom 22. Juli 2002 an.


Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr



Prof. Dr. phil./D. von Engelhardt
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

Prof. Dr. D. von Engelhardt
(Geschichte der Medizin, Vorsitzender)
Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dominiak
(Pharmakologie)

Frau H. Müller
(Pflege)
Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin)
Herr Schneider
(Vors. Richter am Landgericht Lübeck)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm
(Medizinische Klinik I)
Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Kinder- und Jugendmedizin)
Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Sitaru
Klinik für Dermatologie und Venerologie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

Im Hause

Datum: 28.10.2004

nachrichtlich:
Herr Prof. Zillikens
Direktor der Klinik für Dermatologie und Venerologie

Aktenzeichen:
(immer angeben !) 04-144

Sitzung der Ethik-Kommission am 19. Oktober 2004
Antragsteller: Herr Dr. Sitaru / Herr Prof. Zillikens
Titel: Reaktivität von Autoantikörpern mit Strukturproteinen der Haut

Sehr geehrter Herr Dr. Sitaru,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach folgenden Ergänzungen keine Bedenken: In der Aufklärung sind die Zweckbindung und Vernichtung des Materials zu nennen. Die Einwilligung kann, wie in der Aufklärung formuliert, nicht vorausgesetzt werden. Die Aufklärung ist laienverständlich zu formulieren.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
Prof. Dr. Dominiak
(Pharmakologie)

Frau H. Müller
(Pflege)
 Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Schneider
(Vors. Richter am Landgericht Lübeck)
 Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm
(Medizinische Klinik I)
 Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
 Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Sitaru
Klinik für Dermatologie und Venerologie

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

im Hause

Datum: 21.04.2005

nachrichtlich:
Herrn Prof. Zillikens
Direktor der Klinik für Dermatologie und Venerologie

Aktenzeichen:
(immer angeben !) 05-056

Sitzung der Ethik-Kommission am 13. April 2005

Antragsteller: Herr Dr. Sitaru / Herr Prof. Zillikens

Titel: Rolle der Sauerstoffradikalen bei der durch Autoantikörper gegen die Basalmembran induzierten Blasenbildung

Sehr geehrter Herr Dr. Sitaru,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.
Die Kommission hat keine Bedenken.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
Prof. Dr. F. Hohagen
(Psychiatrie)
 Prof. Dr. Dominiak
(Pharmakologie)

Frau H. Müller
(Pflege)
Prof. Wessel
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)
Herr Fieber
(Richter am Landgericht Lübeck)
 Prof. Schwinger
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. H. L. Fehm
(Medizinische Klinik I)
 Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Dr. Schultz
(Pädiatrie)
 Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)



Im Fokus des Lebens
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Dr. Angelika Hüppe

Tel.: +49 451 500 5854

Fax: +49 451 500 5872

angelika.hueppe@uk-sh.de

Universität zu Lübeck · Ratzburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Hr. Prof. Dr. Ludwig
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Haus

Aktenzeichen: 09-140

Datum 13.11.2009

Sitzung der Ethik-Kommission am 06. Oktober 2009, Nachreichung vom 06.11.2009

Antragsteller: Hr. Prof. Dr. Ludwig

Titel: Pathogenese und Therapie Autoantikörper-induzierter Gewebsschädigung

Sehr geehrter Herr Ludwig,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Nach Abschluss des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. Dr. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
☒ Prof. Dr. Schweiger (Psychiatrie)
☒ Prof. Dr. Dendorfer (Pharmakologie)
☒ Frau Prof. E. Stubbe (Theologin)
Prof. Dr. Borek (Medizin- und
Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller
(Pflege)
Dr. Kaiser
(Kinderchirurgie)
☒ Herr Dr. Fieber
(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)
☒ Prof. Schwinger (Humangenetik)

☒ Herr Prof. Dr. Mönig
(Medizinische Klinik I)
☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader
(Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)
☒ Herr D. Stojan
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

8 Danksagung

Die Durchführung dieser Dissertationsarbeit, auch wenn sie länger gedauert hat als gedacht, wäre ohne die Unterstützung von mehreren Personen nicht möglich gewesen. Ihnen möchte ich hier meinen tiefen Dank aussprechen.

Ich danke zunächst Herrn Prof. Dr. med. Zillikens, Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Mein größter, herzlichster Dank für Ausgabe des Themas, die Aufnahme in seine tolle Arbeitsgruppe, die freundlich-fachliche Unterstützung und nicht zuletzt die lang andauernde Betreuung gilt Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig, Leiter des Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie der Universität zu Lübeck.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. med. Andreas Recke, welcher stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und Herrn Dr. med. Michael Kasperkiewicz für die Möglichkeit an seinem HSP-90-Inhibitor-Projekt teilzuhaben. Außerdem danke ich Frau Dr. med. Karoline Holdorf, mit der ich gemeinsam die ersten Schritte in der „Laborwelt“ gehen durfte und gefühlt immer noch die fertigen Objektivträger von losen Zellen „um die Wette frei wasche“.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kolleginnen, Kollegen und gleichzeitig willigen Blutspendern für die Unterstützung, stets freundliche Arbeitsatmosphäre und für die angenehmen Jahre im Labor.

Ich danke meinen Familien und meiner lieben Maria, die während dieser Zeit den Wandel von Freundin zur Ehefrau vollbracht hat, für die verständnisvolle Unterstützung und wenn mal wieder die Schreibpausen zu lang wurden, den hinweisenden Ellenbogen von der Seite.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Hänsel
 Geburtsdatum: 06.02.1987
 Geburtsort: Rostock



Hochschulstudium

10/2005 - 10/2012 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
 09/2007 1. Staatsexamen
 10/2010 - 08/2011 Promotionssemester
 12/ 2012 2. Staatsexamen

Famulaturen

2007 Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Universität zu Lübeck
 2008 Innere Medizin, Universität zu Lübeck
 2009 Dermatologie, Universität zu Lübeck
 2010 Endokrinologie und interdisziplinäre Notaufnahme, University Hospitals Coventry and Warwickshire, Großbritannien
 2011 Ambulanz der Chirurgie, Universität zu Lübeck
 2011 Chirurgie, Hospital Clinico Universitario Valladolid, Spanien

Praktisches Jahr

08/2011 - 07/2012
 - Wahlfach Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde und Phoniatrie, Universitätsklinikum der Universität zu Lübeck
 - Innere Medizin, Sana Klinik Lübeck
 - Chirurgie, Universitätsklinikum der Universität zu Lübeck

Beruflicher Werdegang

seit 07/ 2013 Assistenzarzt der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Universitätsklinikum der CAU Kiel

Zeitraum der Dissertation/ wissenschaftliche Arbeit

02/2009 – 03/ 2011 Erhebung der Daten/ Durchführung der Experimente: Forschungslabor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universität zu Lübeck

01/2013 – 09/2017 Anfertigung und Fertigstellung der Arbeit (Unterbrechungen durch berufliche Tätigkeit), ab 2014 für das Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie-LIED, Universität zu Lübeck

Publikationen

- (1) Hellberg L, Samavedam UK, Holdorf K, **Hänsel M**, Recke A, Beckmann T, Steinhorst K, Boehncke WH, Kirchner T, Möckel N, Solbach W, Zillikens D, Schmidt E, Ludwig RJ, Laskay T (2013) Methylprednisolone Blocks Autoantibody-Induced Tissue Damage in Experimental Models of Bullous Pemphigoid and Epidermolysis Bullosa Acquisita through Inhibition of Neutrophil Activation. *J Invest Dermatol*. doi: 10.1038/jid.2013.91
- (2) Tukaj S, Hellberg L, Ueck C, **Hänsel M**, Samavedam U, Zillikens D, Ludwig RJ, Laskay T, Kasperkiewicz M. (2015) Heat Shock Protein 90 is required for Ex Vivo Neutrophil-driven Autoantibody-induced Tissue Damage in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *Exp Dermatol*. doi: 10.1111/exd.12680
- (3) Müller S, Behnen M, Bieber K, Möller S, Hellberg L, Witte M, **Hänsel M**, Zillikens D, Solbach W, Laskay T, Ludwig RJ. (2016) Dimethylfumarate Impairs Neutrophil Functions. *J Invest Dermatol*. doi: 10.1038/JID.2015.361